



Rôle de la signalisation TPO dans la réparation de l'ADN des cellules souches hématopoïétiques

Bérengère De Lacoste de Laval

► To cite this version:

Bérengère De Lacoste de Laval. Rôle de la signalisation TPO dans la réparation de l'ADN des cellules souches hématopoïétiques. Médecine humaine et pathologie. Université René Descartes - Paris V, 2013. Français. <NNT : 2013PA05S027>. <tel-00950059>

HAL Id: tel-00950059

<https://tel.archives-ouvertes.fr/tel-00950059>

Submitted on 20 Feb 2014

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Université Paris Descartes (Paris 5)
ECOLE DOCTORALE BIOLOGIE ET BIOTECHNOLOGIE (B2T)

THESE

Pour l'obtention du Diplôme de
DOCTEUR DE L'UNIVERSITE PARIS 5
SPECIALITE : Hématologie et Oncologie

Présentée et soutenue publiquement par

Bérengère DE LACOSTE DE LAVAL

Le 10 septembre 2013

**Rôle de la signalisation TPO dans la réparation de l'ADN
des cellules souches hématopoïétiques**

Directrice de thèse : Françoise PORTEU

JURY

Pr Jean SOULIER

Président

Dr Frédéric MAZURIER

Rapporteur

Dr Miria RICCHETTI

Rapporteur

Dr Stephan CONSTANTINESCU

Examineur

Dr Paul Henry ROMEO

Examineur

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury de thèse qui ont gentiment accepté d'évaluer ce travail de thèse:

Dr **Miria Ricchetti** et Dr **Frédéric Mazurier**, merci d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'avoir passé du temps sur mon manuscrit ;

Dr **Paul Henry Romeo** et Pr **Stephan Constantinescu**, merci d'avoir accepté d'être examinateurs de ma thèse ;

Pr **Jean Soulier**, merci de présider ce jury.

Merci beaucoup à **Françoise Porteu**, ma directrice de thèse, de m'avoir accepté dans son équipe sans passer par la case M2 et de m'avoir proposé ce si joli projet. Merci pour ta disponibilité, ta confiance, ton enthousiasme et pour m'avoir très souvent simplifié la vie en faisant le chauffeur. Merci également de m'avoir poussé toujours plus loin, toujours plus de couleurs et toujours moins de cellules ! Merci pour tout.

Merci à tous les membres de mon équipe, présents et anciens. Au côté ERK du groupe, merci à **Muriel, Soizic, Nathalie, Elise et Wissem** de m'avoir d'abord sensibilisé à nos amis les souris, pour tous les conseils que vous m'avez prodigué pendant ces quatre années et pour votre amitié. Merci à **Richard** pour ton aide précieuse et ta sympathie. Je voudrais surtout remercier ceux qui ont travaillé avec moi. Merci à mon super binôme **Patrycja**, pour m'avoir initiée à de nombreuses techniques, pour nos expériences à quatre mains et pour ta gentillesse. Ça a été un plaisir de travailler à tes côtés 😊 ! Aux « jeunes », **Benoit, Alba** et **Daniela** merci pour votre amitié et votre bonne humeur, bonne route à tous les trois! Daniela, bon courage pour ta thèse, prend soin de notre projet !

Je voudrais également remercier tous ceux qui ont travaillé de près ou de loin avec moi, nos collaborateurs et les différentes plateformes de l'institut Cochin. Merci surtout à Emmanuelle et Karine pour nos longues heures passées devant le trieur ! Ma connaissance de la langue française et ma culture générale se sont beaucoup améliorées pendant ce temps-là !

Le septième étage de Gustave Roussy ne serait pas grand-chose sans l'équipe de Patrick et Catherine. Merci à tous pour les moments passés ici, pour l'aide que vous m'avez forcément accordée à un moment ou un autre et pour votre gentillesse à tous. Merci à Mireille de nous avoir bougé un peu en nous proposant mille et une courses ! Fred, Yaël, Lamya, Ségolène, à tous les membres du groupe LAM, Célia, Sarah. A tous les docs qui étaient là à mon arrivé et notamment à Sandrine dont la bonne humeur et l'espièglerie ont mis l'ambiance à l'étage. A ceux qui ont commencé en même temps que moi ou presque : Kevin, Maud et Diane. Kev, plus qu'une année et ça sera ton tour ! Tiens bon et surtout ne te casses rien ! Bon courage à ceux qui sont arrivés un peu plus tard ou qui vont bientôt commencer : Anna, Pierre ... et à tous les stagiaires qui sont passés dans notre bureau !

A tous les membres du bureau des « étudiants » ! Merci pour l'ambiance de travail et de papote ! Ce n'est pas vrai qu'on ne bosse pas dans ce bureau 😊!

Merci également à l'équipe du fond du couloir et notamment aux docs (et anciens) Rosa, Amandine, Sandrine et Jacques pour votre bonne humeur à toutes épreuves et vos blagues (j'en retiendrais surtout une).

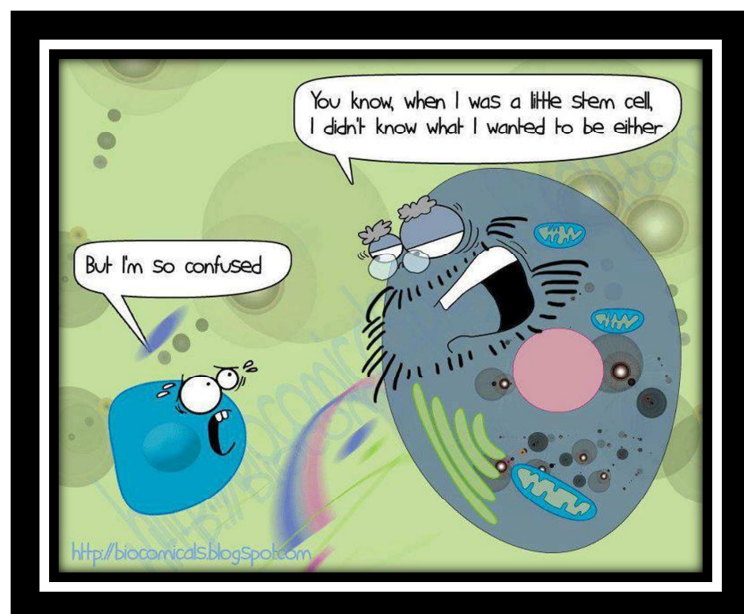
Un petit mot pour tous les autres doctorants que j'ai croisé au cours de ces quatre ans, éparpillés sur tout l'institut. Merci pour votre gentillesse à tous !

Merci à mes copines du labo, Elise et Diane. De collègues, vous êtes passées à amies et confidentes. Merci pour tous nos moments passés, les pauses café, les déjeunés cafèt et bronzage, les activités hors labo 😊 sans oublier nos discussions scientifiques (ou non) ! Merci à toutes les deux d'avoir été là pendant ces trois ou deux dernières années. Avec une pensée

particulière pour ma partenaire de rédaction et presque de soutenance ! Merci Diane d'avoir vérifié les dernières petites fautes sur les bancs du métro à 2h du mat'... On y est presque, on voit le bon bout !!

Et enfin merci à tous ceux qui tous les jours, m'entourent et m'encouragent. Je veux bien sûr remercier mes parents qui m'ont permis d'arriver jusqu'à là, qui n'ont jamais douté de moi et qui m'ont poussé à ces si longues études ! A ma famille et mes amis qui ont tenté de comprendre ce que je fais, même si je crois que pour eux ça restera toujours un mystère.... Et à tous les autres qui trempent dans le métier pour tous nos moments !

Mes derniers mots seront pour mon chéri, mon tout presque mari, merci d'être à mes côtés, de m'avoir supportée et soutenue, d'avoir écarté mes moments de doutes et de m'avoir réconfortée lors des moments difficiles, grâce à ta confiance, ton pragmatisme sans fin et ta bonne humeur éternelle. Merci pour ton amour !



Sommaire

Introduction	0
I. Les cellules souches hématopoïétiques.....	1
A. Hématopoïèse.....	1
B. Les cellules souches hématopoïétiques.....	3
1. Caractérisation des CSH	3
a. Définition fonctionnelle.....	3
b. Définition phénotypique	5
2. Quiescence et dormance des CSH.....	9
3. Auto-renouvellement et différenciation	12
4. La niche hématopoïétique.....	14
a. La Niche endostéale	15
b. La niche vasculaire.....	17
c. Mobilisation des CSH.....	18
d. Les régulateurs	20
II. La signalisation Thrombopoïétine.....	25
A. Les cytokines et leur récepteurs	25
B. La Thrombopoïétine et Mpl	27
1. Mpl	27
2. La Thrombopoïétine	30
C. Rôle dans la mégacaryopoïèse.....	32
D. Rôle dans les CSH	34
E. Les voies de signalisation induites par la TPO.....	35
1. La voie Jak/STAT	38
2. La voie ERK-MAPK	40
3. La voie PI3K-AKT	43
F. Inhibiteurs des voies de signalisation	44
G. Régulation de l'expression membranaire de Mpl.....	48
H. Dysfonctionnement TPO/Mpl.....	50
1. Néoplasme Myéloprolifératif (NMP).....	51
2. Thrombocytopénie héréditaires (TH).....	53
3. CAMT	53

III. Dommages de l'ADN et réparation	56
A. Induction de dommages de l'ADN	56
B. Reconnaissance des cassures	58
C. Arrêt du cycle cellulaire	61
D. Apoptose et senescence	63
E. Voies de réparation	65
1. Cassures simple brin	65
2. Cassures double brins	67
a. La voie de la recombinaison homologue (RH)	68
b. La voie de la Non Homologous End Joining (NHEJ)	70
(1) Mécanisme	70
(2) DNA-PK	73
c. La voie NHEJ alternative (Alt-NHEJ)	78
d. Le choix des voies de réparation	80
(1) Compétition entre NHEJ et Alt-NHEJ	80
(2) Compétition entre RH et NHEJ	81
F. Réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules souches	83
1. Résistance des cellules souches aux stress génotoxiques	83
2. Zoom sur les cellules souches hématopoïétiques	83
Projet de Thèse	88

ARTICLE 1 : La TPO limite la mutagenèse et la perte de fonction à long terme des CSH induits par des dommages à l'ADN en stimulant une voie dépendante de la DNA-PK	93
A. Introduction	94
B. Résultats	94
C. Conclusion	96
D. Article	96

ARTICLE 2 : L'effet protecteur de la TPO sur l'intégrité génomique des CSH nécessite une coopération des voies ERK, NF-kB et IEX-1	117
A. Introduction	118
B. Résultats	118
C. Conclusion	120
D. Article	120

Discussion/ Perspectives	121
I. Rôle de la TPO dans la réparation de l'ADN des CSH	154
A. La TPO induit une radiorésistance des CSH	154
B. Rôle de la TPO sur la voie NHEJ	156
C. Intérêt d'une injection TPO avant thérapie	160
D. Importance du timing	161
II. Les voies de signalisation en aval du récepteur Mpl	162
A. ERK	162
B. NF- κ B	164
C. IEX-1	167
D. Conclusion.....	169
III. Importance du niveau de Mpl dans les CSH	170
A. Mpl et IEX-1 sont-ils suppresseurs de tumeurs ?	170
B. Le niveau de Mpl est déterminant dans l'activation des voies de signalisation.....	172
IV. La TPO induit-elle une chimiorésistance ?.....	174
 Références Bibliographiques	 177
 Annexe1 : ARTICLE	 195
Annexe2 : Figures discussion	222
Abbreviations	227

Table des illustrations

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des cellules souches hématopoïétiques humaines.	7
Tableau 2: Marqueurs phénotypiques des cellules souches hématopoïétiques murines.....	8
Tableau 3 : Liste non exhaustive des régulateurs de quiescence des CSH.	13
Tableau 4 : Effet de quelques mutations touchants les voies de réponse aux dommages de l'ADN sur la fonction et la maintenance des CSH.....	85
Figure 1 : Hiérarchie du système hématopoïétique et influence des cytokines sur la différenciation...	2
Figure 2 : Entrée des CSH dans le cycle cellulaire	11
Figure 3 : Modèle des différentes niches de la moelle osseuse.....	14
Figure 4 : Interactions entre la CSH et la niche endostéale	21
Figure 5 : Voies moléculaires entre la niche et la CSH	24
Figure 6 : Les récepteurs de classe I.....	27
Figure 7 : Structure du gène c-mpl et de la protéine associée.....	28
Figure 8 : Expression de Mpl dans le système hématopoïétique.....	29
Figure 9 : Structure du gène et de la protéine TPO.....	30
Figure 10 : Schéma de la mégacaryopoïèse	33
Figure 11 : Modèle d'activation de Mpl	36
Figure 12 : Signalisation en aval de TPO/Mpl.....	37
Figure 13 : Organisation structurale des Jak	38
Figure 14 : ERK est activée par différentes voies en réponse à la TPO	41
Figure 15 : Principaux inhibiteurs des voies de signalisation TPO/Mpl.	44
Figure 16 : Rôle des SOCS dans l'inhibition de la signalisation TPO.....	45
Figure 17 : Modèle de régulation de Mpl.....	49
Figure 18 : Un dysfonctionnement de la voie TPO/Mpl est à l'origine de la thrombocytopénie amegacaryocytaire congénitale (CAMT), des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) ou des thrombocytopénies héréditaires (TH).....	51
Figure 19 : Schématisation des mutations de Mpl trouvées dans les NMP et les TH	53
Figure 20 : Schématisation des mutations de Mpl trouvées dans les CAMT	54
Figure 21 : Les différentes voies de réparation de l'ADN.....	57
Figure 22 : La réponse aux dommages de l'ADN.....	60
Figure 23 : Schéma de la mise en place des checkpoints.....	62
Figure 24 : Mise en place de l'apoptose en réponse à un stress génotoxique	64
Figure 25 : Voies de réparation mises en place lors d'induction de cassure simple brin.	66
Figure 26 : La réparation de l'ADN est bi-phasique.....	68
Figure 27 : La voie de la recombinaison homologue (RH).....	69
Figure 28: La voie NHEJ	71
Figure 29 : Structure fonctionnelle de la DNA-PKc.	73
Figure 30 : L'autophosphorylation de DNA-PK est indispensable pour promouvoir la NHEJ	75
Figure 31 : Mécanismes d'utilisation des microhomologies	79
Figure 32 : La voie NHEJ Alternative.....	79
Figure 33 : Compétition entre les différentes voies de réparation.....	82
Figure 34: Réponses aux dommages de l'ADN dans les cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques murins.	86

Figure 35 : IEX-1 est impliqué dans divers processus cellulaires.....	90
Figure 36 : Structure de IEX-1.....	91
Figure 37 : Les souris déficientes pour IEX-1 présentent des aberrations chromosomiques persistantes deux mois après irradiation	91
Figure 38 : IEX-1 est exprimé en réponse à la TPO.....	92
Figure 39 : Schéma de l'impact de la TPO sur la réparation de l'ADN des CSH.....	159
Figure 40 : Schéma de la voie NF-kB classique et de la voie dépendante d'ATM.....	165
Figure 41 : Voies de signalisation en aval de la TPO impliquées dans l'activation de la DNA-PK et de la NHEJ.....	169

Introduction

I. Les cellules souches hématopoïétiques

A. Hématopoïèse

L'hématopoïèse est le processus biologique qui permet la production de toutes les cellules sanguines. La plupart de ces cellules ont une vie courte et doivent être continuellement renouvelées. Par exemple, le temps de vie des granulocytes est de quelques heures, celui des globules rouges de quelques semaines et celui des cellules mémoires T de plusieurs années. Ce processus de renouvellement est appelé homéostasie.

A l'origine se trouvent les cellules souches hématopoïétiques (CSH), une population de cellules indifférenciées, quiescentes, capables d'auto-renouvellement ou de prolifération et de différenciation en réponse à un signal exogène.

La différenciation des CSH va donner des progéniteurs dits indifférenciés : les progéniteurs communs lymphoïdes (CLP) à l'origine des lymphocytes (NK, T et B) et les progéniteurs communs myéloïdes (CMP). Ces derniers donneront des précurseurs desquels partiront les lignées granulo-macrophagiques (GMP), aboutissant aux polynucléaires et macrophages, et les progéniteurs érythro-mégacaryocytaires (MEP) qui donneront les globules rouges et les plaquettes. Ces différentes étapes sont sous le contrôle de voies de signalisation qui peuvent être activées par les cytokines ou facteurs de croissance hématopoïétiques (Figure 1).

L'hématopoïèse démarre tôt dans le développement embryonnaire. Elle se forme à partir de cellules mésodermiques et prend place dans les ilots du sac vitellin. Chez l'homme, à partir du troisième mois de gestation, les cellules hématopoïétiques migrent dans le foie, la rate et les ganglions lymphatiques et enfin prennent place définitivement dans la moelle osseuse à partir du sixième mois. Les CSH embryonnaires prolifèrent et se différencient pour donner tout le système hématopoïétique adulte. La première phase est l'hématopoïèse primitive qui permet la production de quantité de globules rouges. La seconde phase, l'hématopoïèse

définitive permet la mise en place de tous les lignages hématopoïétiques et la production des CSH capables de coloniser la moelle osseuse (Cumano and Godin, 2007).

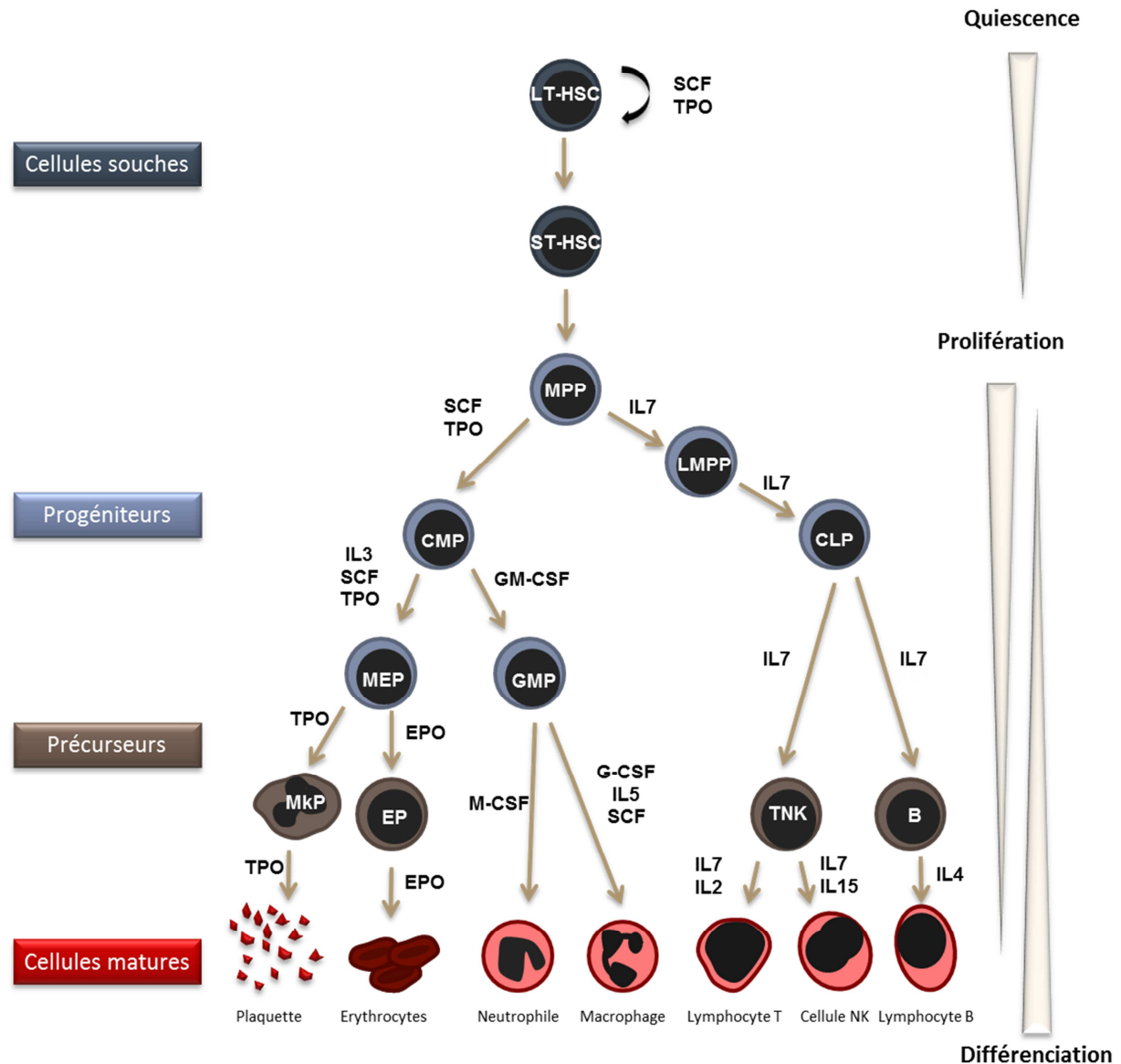


Figure 1 : Hiérarchie du système hématopoïétique et influence des cytokines sur la différenciation

L'hématopoïèse est caractérisée par la formation de toutes les cellules du sang à partir d'une unique CSH multipotente, quiescente et capable d'auto-renouvellement. La CSH va donner des progéniteurs qui vont s'engager vers un lignage particulier.

Ceux-ci vont changer morphologiquement pour donner des précurseurs qui vont subir des étapes de maturation.

Ces différentes étapes sont régulées par des cytokines. Certaines ont un rôle sur un lignage spécifique tandis que d'autres vont avoir un effet pléiotropique.

L'hématopoïèse permet chaque jour la production de 10^{12} cellules sanguines, et doit assurer un nombre constant de cellules malgré des variations pouvant être plus ou moins importantes. C'est pour cela que le compartiment des CSH et leur différenciation sont particulièrement bien contrôlés par des facteurs de transcription spécifiques de chaque lignée hématopoïétique et par des facteurs de croissance.

B. Les cellules souches hématopoïétiques

Pendant la vie post-natale, les CSH constituent un petit pool de cellules d'environ 0,001 % des cellules de la moelle osseuse. La majorité des CSH sont quiescentes et sont résistantes à des traitements comme le 5-FluoUracile ou l'hydroxyurée, des drogues qui éliminent les cellules en prolifération (Lerner and Harrison, 1990) (Randall and Weissman, 1997).

Chez l'adulte, la production des cellules du sang se fait exclusivement grâce à un pool de CSH qui réside dans la moelle osseuse. Cependant lors de conditions pathologiques associées à une déplétion de la moelle osseuse, la production des cellules du sang peut se faire à partir d'autres sites de l'hématopoïèse fœtale comme le foie et la rate (Taniguchi et al., 1996) (Morita et al., 2011). En réponse à des stress hématopoïétiques tel que les transplantations, les saignements, les infections ou les agents radio- ou chimio-thérapeutiques, les CSH deviennent actives et prolifèrent rapidement pour générer des progéniteurs et des cellules matures et ainsi compenser la perte de cellules sanguines (Passegué et al., 2005) (Wilson et al., 2009).

1. Caractérisation des CSH

a. Définition fonctionnelle

Une cellule souche hématopoïétique est définie par sa capacité à repeupler tous les lignages hématopoïétiques *in vivo* (multipotence), à garder un stock de CSH durant

toute la vie d'un individu tout en maintenant l'homéostasie du tissu (auto-renouvellement).

Les premières cellules souches hématopoïétiques ont été identifiées sur leur capacité à former des colonies dans la rate de souris irradiées de façon létale douze jours après transplantation. Chacune des colonies provient d'une cellule unique et est appelée CFU-S (Colony Forming Unit Spleen) (Till and McCulloch, 1961) (Wu et al., 1968).

Différents tests *in vitro* ont permis de mettre en évidence la multipotence des CSH. Ces tests utilisent la capacité clonale d'une CSH lorsqu'elle est cultivée dans un milieu approprié semi-solide qui permet de réduire la mobilité des cellules et de développer des colonies à partir d'une seule cellule. Ces colonies sont appelées CFU (Colony Forming Unit) (Bradley and Metcalf, 1966). En fonction des facteurs de croissance présents dans le milieu, les cellules vont se différencier vers un lignage et donner un type de CFU. Ainsi, les CFU-A (CFU de type A) sont les colonies les plus indifférenciées, elles ont une capacité de prolifération et un potentiel de reconstitution importants. Les CFU-GEMM correspondent aux progéniteurs myéloïdes pluripotents et les CFU-GM correspondent aux progéniteurs granulocytaires et macrophagiques (Gunsilius et al., 2001).

Cependant, les CFU forment une population de cellules hétérogène. Pour analyser le potentiel CSH de ces cellules, plusieurs tests sont possibles. *In vitro*, les LTC-IC (Long Term Culture-Initiating Cell) et les CAFC (Cobblestone Area Forming Cell) sont des tests de culture à long terme sur des cellules stromales productrices de cytokines. Ils permettent de détecter des CSH plus primitives qui sont capables de différenciation dans tous les lignages (Sutherland et al., 1989) (Ploemacher et al., 1989). Cependant, il est difficile d'établir une relation entre les CSH et les cellules capables d'être cultivées sur du long terme.

In vivo, l'injection de cellules de la moelle osseuse et leur capacité à reconstituer des souris receveuses irradiées de façon létale permet de mesurer la clonogénicité des CSH. Une seule CSH étant capable de reconstituer la moelle d'un hôte irradié, des

expériences utilisant des dilutions limites de cellules de la moelle permettent de quantifier la fréquence des CSH (Sieburg et al., 2006).

Les CSH ne sont morphologiquement pas distinguables des progéniteurs. Fonctionnellement, différents groupes peuvent être identifiés sur leur capacité à reconstituer la moelle osseuse d'hôtes irradiés et leur capacité à s'auto-renouveler et produire des cellules plus matures. Ainsi, les CSH ayant une capacité de reconstitution à long terme, de plus de six mois (LT-CSH, Long Term-CSH), peuvent être transplantées dans des hôtes secondaires voire tertiaires (Domen and Weissman, 1999). Les CSH pouvant reconstituer à court terme, uniquement sur quatre à douze semaines sont appelées ST-CSH (Short Term-CSH). Les progéniteurs multipotents (MPP) sont capables de produire des cellules dans la moelle osseuse uniquement pendant quatre à douze jours (Jones et al., 1989) (Harrison and Zhong, 1992) (Zhong et al., 1996). Quant aux progéniteurs, ils n'ont plus de capacité d'auto-renouvellement et ont un fort potentiel de prolifération et de différenciation vers une lignée déterminée. Les précurseurs sont distinguables morphologiquement (Kondo et al., 1997) (Akashi et al., 2000).

Des modèles de souris immuno-déficientes (SCID) permettent la transplantation de CSH humaines et la mesure de leur activité. La définition d'une LT-CSH est un peu différente pour une xénogreffe. Il a été évalué que les cellules produites après douze semaines proviennent d'une LT-HSC (Doulatov et al., 2012).

b. Définition phénotypique

Les CSH ainsi que les progéniteurs les plus primitifs sont distinguables par l'absence des marqueurs de surface spécifiques des lignages associés à une maturation terminale des cellules tel que B220, CD3e, Gr1, CD11b et Ter119 (Lignage négatif : Lin-). Puis, différents marqueurs phénotypiques ont été mis en évidence pour discriminer les différents compartiments hématopoïétiques et notamment les CSH. Ces marqueurs sont différents chez l'homme et chez la souris.

Marqueurs humains

Le CD34 a été le premier marqueur mis en évidence sur les CSH. Il est exprimé sur 1 à 4 % des cellules nucléées de la moelle (Civin et al., 1984). Cependant moins de 20% des cellules possédant le CD34 sont capables de culture à long terme (LTC-IC). D'autres marqueurs ont ensuite été mis en évidence. Thy1 (CD90) en association avec CD34 définit une population de cellules pouvant se différencier en tous les lignages dans les souris SCID. Les cellules positives pour le CD34 et négatives pour le CD38 ont la capacité de donner tous les lignages de la moelle après une transplantation d'animaux immunodéprimés irradiés de façon létale (Terstappen et al., 1991). D'autres marqueurs tels que HLA-DR et CD45RA sont absents ou peu exprimés sur les CSH et les progéniteurs primitifs. KIT et KDR (appelé également VEGFR-2 pour Vascular Endothelial Growth Factor Receptor 2) sont exprimés sur les CSH et les progéniteurs. Ils recouvrent environ deux tiers et 0.1 à 0.5% respectivement des CD34⁺. Les cellules CD34⁺KDR⁺ ou CD34⁺KIT⁺ sont enrichies en cellules capables de LTC-IC et de reconstituer des souris NOD/SCID (Ziegler et al., 1999) (Ratajczak et al., 1999). Le marqueur CD133 est peu utilisé car a un patron d'expression similaire au CD34, et s'il permet d'enrichir les CSH, il ne permet pas leur discrimination (Gunsilius et al., 2001). Finalement il apparaît que les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻Thy1⁺ représentent les LT-CSH.

La discrimination des ST-CSH et des MPP est beaucoup plus récente. Le marqueur CD38 est graduellement exprimé sur les cellules en différenciation. Ainsi les CD34⁺CD38^{lo} sont capables de reconstituer des souris NOD/SCID pendant seulement deux semaines (Mazurier et al., 2003). De la même façon, les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻Thy1⁻ ont une capacité de reconstitution transitoire (Majeti et al., 2007). De nouveaux marqueurs ont également été mis en évidence, CD49b est exprimé sur les LT- et les ST-CSH (Benveniste et al., 2010) tandis que CD49f est exprimé sur 50% des cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻Thy1⁺. Les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻CD49f sont capables de reconstitution à long terme tandis que les cellules CD34⁺CD38⁻CD45RA⁻Thy1⁻CD49⁻ ne peuvent reconstituer que transitoirement (Notta et al., 2011).

LT-HSC	ST-CSH /MPP	CLP	CMP	GMP	MEP
Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻
CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺
CD38 ⁻	CD38^{lo}	CD38^{lo}	CD38⁺	CD38⁺	CD38⁺
Thy1 ⁺	Thy1⁻	CD45RA ⁺	CD45RA⁻	CD45RA ⁺	CD45RA⁻
CD45RA ⁻	CD45RA ⁻	CD10 ⁺	Flk2⁺	Flk2⁺	Flk2⁻
CD49f ⁺	CD49f⁻	CD7 ⁻	CD10 ⁻	CD10 ⁻	CD10 ⁻
			CD7 ⁻	CD7 ⁻	CD7 ⁻

Tableau 1 : Marqueurs phénotypiques des cellules souches hématopoïétiques humaines. (D'après Doulatov et al., 2012)

Marqueurs murins

Deux méthodes de marquage ont été identifiées pour analyser les CSH par cytométrie en flux : les marqueurs de surface et la propriété des CSH à ne pas absorber certains colorants.

La présence de certains antigènes comme le SCA et le KIT sur les cellules Lin⁻ forment les LSK (Lin⁻SCA⁺KIT⁺). Ce groupe de cellules est enrichi en CSH. Il représente 0.1% de la moelle osseuse (Spangrude et al., 1988). Deux types d'immuno-marquage permettent de mettre en évidence les LT-CSH :

- Les cellules LSK négatives pour les marqueurs CD34 et Flk2 (appelé aussi Flt3 ou CD135) sont nommées LSK-CD34⁻ Flk2⁻. Ces cellules sont enrichies en CSH mais seulement 40 % ont une capacité de reconstitution à long terme (Osawa et al., 1996) (Takano et al., 2004) (Adolfsson et al., 2005) (Christensen and Weissman, 2001).
- Les CSH expriment fortement le CD150 mais pas le CD48 formant les LSK-CD150⁺CD48⁻ (appelées aussi LSK SLAM). 50% de ces cellules sont capables de reconstitution à long terme (Kiel et al., 2005).

Finalement, des essais de transplantation unicellulaire ont montré qu'environ deux tiers des LSK-CD34⁻CD48⁻CD150⁺ possèdent la capacité de reconstituer des animaux irradiés de façon létale (Kiel et al., 2005).

La deuxième stratégie est fondée sur la haute capacité d'efflux des CSH pour des colorants de l'ADN, tel que le Hoechst 33342 et de la mitochondrie, tel que la Rhodamine 123 (Goodell et al., 1996) (Li and Johnson, 1992). Cette propriété est due à la forte expression de transporteurs anti-drogue à la membrane des CSH qui leur permettent d'éjecter ces marqueurs (Zhou et al., 2001). Ceci résulte en une faible rétention de ces marqueurs et ces cellules sont appelées SP (side population). Les cellules SP sont enrichies en CSH et l'addition des marqueurs de surface SCA et KIT a permis de définir une population de CSH équivalente à des LSK-CD34⁻CD48⁻Flk2⁻ (Lin and Goodell, 2011).

Quiescence

LT-HSC	ST-CSH	MPP	LMPP	CLP	CMP	GMP	MEP
Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻	Lin ⁻
SCA ⁺	SCA ⁺	SCA ⁺	SCA ⁺	SCA ^{lo}	SCA ⁻	SCA ⁻	SCA ⁻
KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺	KIT ⁺
CD34 ⁻	CD34 ⁺	CD34 ⁺	CD34 ⁺	Flk2 ⁺	CD34 ^{hi}	CD34 ^{lo}	CD34 ^{lo}
CD150 ⁺	CD150 ⁺	CD150 ⁻	Flk2 ⁺	CD127 ⁺	FcγR ⁻	FcγR ⁺	FcγR ⁻
CD48 ⁻	Flk2 ⁺	Flk2 ⁺	CD127 ⁺				
Flk2 ⁻							

Tableau 2: Marqueurs phénotypiques des cellules souches hématopoïétiques murines. (D'après Doulatov et al., 2012)

Il a été observé un biais myéloïde ou lymphoïde des CSH en fonction des marqueurs qu'elles expriment. Ainsi les LSK-CD34⁻ qui expriment fortement le CD150 donneront majoritairement des progéniteurs lymphoïdes et les LSK-CD34⁻ qui l'expriment faiblement, des progéniteurs myéloïdes (Morita et al., 2010). De même, les SP qui expriment les marqueurs SCA et KIT, se distinguent par leur capacité à retenir les

colorants faiblement ou fortement donneront des myéloïdes ou des lymphoïdes respectivement (Goodell et al., 1996).

Il existe d'autres marqueurs de CSH qui sont moins utilisés. Ainsi les CSH sont également positives pour Mpl (CD110), Tie2, CD105, CXCR4 et EPCR et négatives pour CD244 (Arai et al., 2004) (Balazs et al., 2006).

Ces différents marquages ont permis de quantifier les LT-CSH qui représentent moins d'une cellule pour 10^6 cellules de moelle osseuse, et ce nombre reste sensiblement constant durant la vie d'un individu.

2. Quiescence et dormance des CSH

Alors que chez les mammifères, la plupart des cellules sont en phase G1 du cycle cellulaire, les cellules souches sont majoritairement en phase G0. Pendant cette phase de repos, le métabolisme de la cellule est ralenti. En effet, l'analyse de l'expression génique réalisée à partir de CSH quiescentes et actives a montré une diminution de la transcription des ARN et un métabolisme diminué dans les CSH quiescentes (Venezia et al., 2004).

De nombreuses études ont permis de comprendre les mécanismes qui d'une part maintiennent les CSH en quiescence et d'autre part sont capables de les faire entrer rapidement en cycle pour répondre à une demande (Figure 2, Tableau 3). Certains facteurs se sont révélés critiques dans le maintien en quiescence des CSH, c'est le cas de p53, p21, p57, p27 et c-myc ainsi que des cyclines et leur kinases associées (CDK, Cycline Dependant Kinase). p53, p57, p21 et p27 sont des régulateurs du cycle cellulaire et marqueurs de la quiescence des CSH. Ils sont fortement exprimés dans les LT-CSH comparés à des progéniteurs. Leur délétion provoque une augmentation de la prolifération des CSH et une diminution de leur capacité à reconstituer un hôte (Dumble et al., 2007) (Liu et al., 2009) (Cheng et al., 2000) (Zou et al., 2011). A l'inverse, c-myc est peu exprimé dans les cellules quiescentes mais son expression augmente lors des phases d'initiation de la différenciation (Wilson et

al., 2004) (Murphy et al., 2005). Dans les CSH, il régule négativement p21 (Wu et al., 2003). Une surexpression de c-myc entraîne une perte des CSH due à une augmentation de leur prolifération et un épuisement du stock (Wilson et al., 2004).

Différents types de marquages cellulaire sont usuellement utilisés pour discriminer la phase G0 des autres phases du cycle cellulaire. Ces techniques sont basées sur l'absence d'activité dans les CSH. Ainsi les cellules en G0 n'expriment pas Ki67, une protéine nucléaire exprimée pendant les phases actives du cycle, et sont peu marquée par la pyronine Y ou l'acridine orange qui colorent l'ARN. *In vivo*, l'injection de BrdU, une molécule qui s'incorpore dans l'ADN des cellules en cours de réplication et qui peut être détectée par des anticorps spécifiques, permet de discriminer les cellules en cycle des cellules quiescentes.

Des expériences de marquage au BrdU ou avec du Hoechst et de la Pyronine Y montrent que les cellules ST-CSH et les MPP sont plus fortement marquées. Ainsi, environ 70% des LT-CSH, 60% des ST-CSH et 50% des MPP sont en phase G0 (Passegué et al., 2005).

La quiescence des CSH est un atout pour réduire le risque de mutation de l'ADN et de transformation oncogénique. En effet, les CSH quiescentes minimisent le risque d'erreur lors de la réplication de l'ADN ainsi que la production des espèces réactives de l'oxygène (ROS), et ont le temps nécessaire pour réparer l'ADN. Les CSH sont également protégées des drogues génotoxiques tel que les agents chimio thérapeutiques antiprolifératifs (Jang and Sharkis, 2007) (Venezia et al., 2004) (Randall and Weissman, 1997).

L'analyse du compartiment des CSH a montré qu'une partie des cellules sont dormantes, c'est-à-dire qu'elles se divisent moins de cinq fois pendant la vie d'un individu, et ont un potentiel de reconstitution important (Wilson et al., 2008). Le marquage de la chromatine des CSH avec une protéine fusion Histone H2B-GFP permet de suivre la prolifération des cellules. A chaque cycle de division, l'intensité de coloration de la cellule est diminuée de deux fois. Il a été ainsi mis en évidence

que dans la population des CSH, 15% des cellules sont dormantes et se divisent en moyenne tous les 145 jours tandis que 85% des cellules sont plus actives et se divisent environ une fois par mois (Wilson et al., 2008) (Foudi et al., 2009). L'isolation des CSH actives et dormantes grâce à la protéine fusion Histone H2B-GFP a permis de réaliser des expériences de reconstitution. Ces dernières ont mis en évidence que les cellules les plus dormantes sont celles qui ont un pouvoir de reconstitution le plus important (Wilson et al., 2008) (Foudi et al., 2009). Ces deux types de population restent cependant difficiles à discriminer phénotypiquement car elles présentent les mêmes marqueurs de surfaces LSK-CD34⁻CD150⁺CD48⁻.

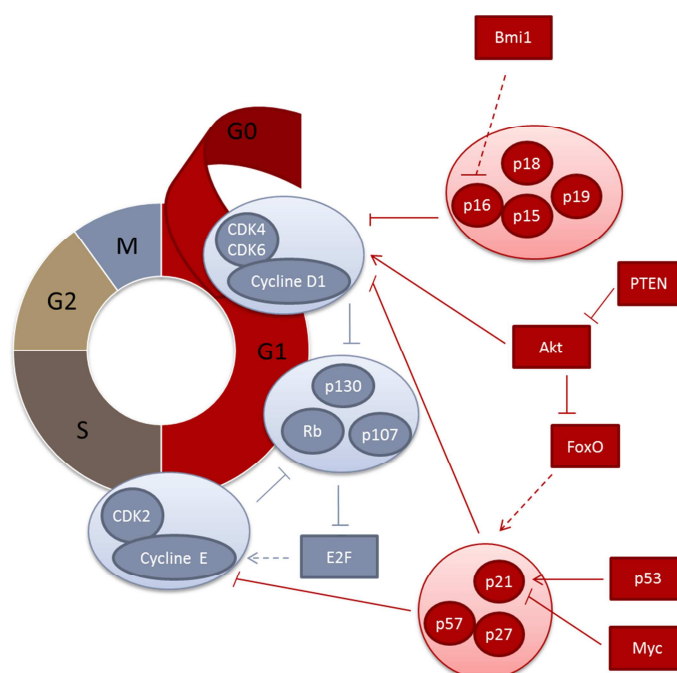


Figure 2 : Entrée des CSH dans le cycle cellulaire

La régulation du cycle cellulaire des CSH se fait principalement par deux familles d'inhibiteurs. Les Ink4 se composent de p16, p15, p19 et p18, ils régulent la phase précoce de l'entrée en cycle. Le groupe des protéines CIP/KIP comprend p57, p27 et p21 et contrôle les phases précoces et tardives de la phase G1. De nombreux autres régulateurs sont associés à ces protéines et permettent notamment l'interaction avec l'environnement de la cellule. (D'après Pietras et al., 2011).

Les CSH actives assurent l'homéostasie du système hématopoïétique tandis que les CSH dormantes servent de réservoir et peuvent être activées lors d'un signal de stress. Ce processus est réversible, puisque les CSH actives peuvent retourner dans un état dormant. Ainsi, c'est l'homéostasie ou la nécessité de reconstituer

l'hématopoïèse après un stress qui détermine la balance entre les états dormants ou actifs de la CSH (Wilson et al., 2008).

3. **Auto-renouvellement et différenciation**

L'auto-renouvellement des CSH est un processus qui est limité puisque lors d'expériences de transplantations en série, les CSH perdent leur capacité de reconstitution. De plus, la prolifération des CSH est inversement corrélée à leur capacité d'auto-renouvellement et à leur pouvoir de reconstitution. C'est, comme discuté précédemment, le cas des CSH de souris invalidées pour p53, p57, p21 ou p27. Ainsi la quiescence est importante dans le maintien du stock de CSH (Orford and Scadden, 2008).

Les CSH peuvent avoir soit une division symétrique et alors donner deux autres CSH identiques soit une division asymétrique. Dans ce dernier cas, la cellule donnera après la mitose une autre cellule souche qui permet le maintien de l'identité de la CSH et une cellule qui entrera en différenciation. Deux hypothèses non exclusives ont été proposées pour expliquer cette asymétrie (Figure 3) (Wilson and Trumpp, 2006).

- La première est la présence de déterminants dans le cytoplasme de la CSH. Lors de la mitose, ces déterminants vont aller se positionner d'un seul côté de la cellule et une unique cellule fille les récupéra donnant ainsi deux cellules non identiques (Wilson and Trumpp, 2006).
- La deuxième hypothèse tient compte de la présence de la CSH dans la niche. Après la mitose, les cellules filles se trouveront dans des microenvironnements différents. L'une restera en contact avec la niche et gardera une identité souche tandis que l'autre sera plus éloignée. L'échange avec la niche ne sera donc plus le même ce qui lui donnera un signal de différenciation (Ho, 2005) (Wilson and Trumpp, 2006).

Catégorie	Effet	Régulateurs de quiescence	
Régulateurs extrinsèques	+	SCF/KIT, Tie2/Ang1, TPO/Mpl, CXCL12/CXCR4 Hypoxie, ions Ca ²⁺ N-Cadherine, Intégrine, OSP Wnt	Cytokine/Récepteur Environnement Composant de la MEC Voie de signalisation
	-	Hedgehog	Voie de signalisation
Régulateurs intrinsèques	+	Gfi1, p53, Pbx1, Bmi1 P21, p57, p27, p18, Rb, CDK4/6, CDK2 Cyclin D1/ D2/ D3 PTEN, Akt, FoxO	Facteur de transcription Régulateurs du cycle cellulaire Voie PI3K
	-	MEF, Lnk, MYC, Evi1	

Tableau 3 : Liste non exhaustive des régulateurs de quiescence des CSH.

(D'après Pietras et al., 2011)

Les mécanismes qui régulent le choix entre l'auto-renouvellement et la différenciation sont importants. Ils sont associés à des changements dans l'expression des gènes qui est modulée par des facteurs de transcription tels que p53, Gfi1 et Bmi1 (Tableau 3). C'est le cas de la protéine Myc qui est importante dans la différenciation des CSH. Son expression dans les CSH diminue l'expression de protéines d'adhésion comme les N-cadhérine et les intégrines, les CSH ne vont donc plus être en contact avec la niche et vont avoir un signal de différenciation. Ainsi les CSH de souris déficientes pour *c-myc* ont un défaut de différenciation et une augmentation du nombre de CSH dans la niche. Inversement, une surexpression de Myc entraîne un pancytopenie due à une différenciation et une perte des CSH (Wilson et al., 2004).

Ainsi, une rupture de cette subtile balance entre quiescence, prolifération et différenciation entraîne une perte des CSH et un défaut de leur fonctionnalité.

4. La niche hématopoïétique

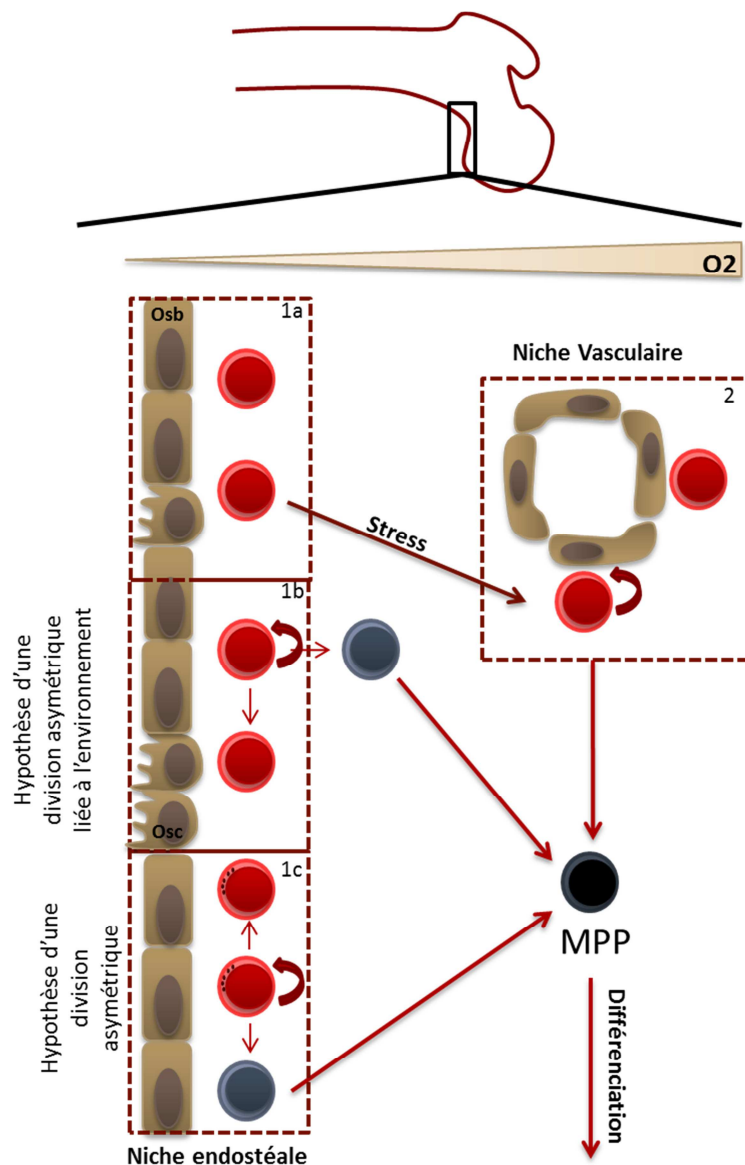


Figure 3 : Modèle des différentes niches de la moelle osseuse

La niche endostéale contient majoritairement des ostéoblastes (Osbs) et des ostéoclastes (Oscs). Elle se compose de zones de stockage des CSH quiescentes (1a) et de zones d'auto-renouvellement (1b et 1c). En réponse à un stress, les CSH quiescentes deviennent actives et migrent vers la niche vasculaire (2). Elles vont ensuite se différencier en progéniteurs multipotents (MPP). L'auto-renouvellement des CSH peut se faire par divisions symétriques (2) ou par divisions asymétriques dépendantes de l'environnement (1b) ou de déterminants cellulaires (1c).

Le terme niche a été utilisé pour la première fois en 1978 pour désigner un microenvironnement de l'os spécifique des CSH qui leur permet de se diviser de

façon illimitée (Schofield, 1978). Sans cellules stromales, les CSH ne peuvent pas être maintenues *in vitro*, ce qui montre l'importance du microenvironnement dans lequel elles se trouvent. Il est spécifique puisque d'autres tissus comme la rate ne sont pas capables de maintenir les CSH de la même façon que la moelle osseuse (Schofield, 1978). La niche est hypoxique et permet le maintien de l'identité de la cellule et sa capacité d'auto-renouvellement (Cipolleschi et al., 1993). L'homéostasie est donc également maintenue par les cellules de la niche puisqu'elles sont capables de sentir et de répondre aux besoins de l'organisme.

La localisation de la niche a été montrée *in vivo* par les mêmes techniques que la dormance des CSH, c'est-à-dire grâce à l'utilisation de souris transgéniques et inducibles pour H2B-GFP ou par intégration de BrdU. Ces deux techniques nécessitent une période de marquage des cellules suivie d'une chasse pendant laquelle les cellules proliférantes perdent le marquage. Les CSH qui sont peu proliférantes retiennent donc le BrdU ou la coloration GFP. Des analyses par microscopie de coupes d'os ont montré que les CSH se trouvent dans des petites cavités de la zone trabéculaire de l'os (Zhang et al., 2003) (Kiel et al., 2005).

La niche de la moelle osseuse se divise en deux zones, la niche endostéale et la niche vasculaire (Figure 3).

a. ***La Niche endostéale***

La niche endostéale de l'os se trouve à la limite entre la moelle osseuse et l'os. Des expériences de transplantation des CSH suivi de microscopie ont permis de mettre en évidence une localisation spécifique de ces cellules. Les CSH les plus immatures se trouvent dans des cavités au niveau de l'endosteum des régions trabéculaires des os longs, alors que les progéniteurs plus différenciés sont dans les régions centrales de la moelle osseuse (Lord et al., 1975) (Gong, 1978) (Askenasy and Farkas, 2003) (Nilsson et al., 2001) (Sipkins et al., 2005). Ceci a permis la mise en évidence d'un stroma spécifique de l'os nécessaire aux CSH.

Les ostéoblastes, cellules qui permettent la formation de l'os, et les ostéoclastes, macrophages de l'os qui permettent la résorption de l'os, ont été caractérisés comme

des cellules clés de la niche hématopoïétique (Patt and Maloney, 1972). Ces deux types de cellules permettent l'homéostasie et le remodelage de l'os. Les modèles murins défectueux pour ces deux types de cellules présentent un défaut hématopoïétique important avec une diminution ou une augmentation du nombre de CSH lorsque les ostéoblastes sont respectivement diminués ou augmentés (Visnjic et al., 2004) (Lympéri et al., 2011). Les ostéoblastes de l'endosteum sont capables de sécréter un grand nombre de cytokines qui permettent la prolifération des cellules hématopoïétiques *in vitro* en augmentant leur capacité d'auto-renouvellement (Taichman et al., 2000) (Calvi et al., 2003). De plus, la co-transplantation des CSH avec des ostéoblastes augmente leur capacité de prise de greffe (El-Badri et al., 1998).

Le rôle des ostéoclastes a moins été étudié et est controversé. Miyamoto et al. ont montré que les ostéoclastes ne sont pas nécessaires à la mobilisation des CSH et qu'ils agissent comme des régulateurs négatifs de l'hématopoïèse (Miyamoto et al., 2011). Une autre étude réalisée par Mansour et al. montre que la perte des ostéoclastes induit une hématopoïèse extra-médullaire ainsi qu'un défaut d'ossification de l'os, une diminution des ostéoblastes et de la prise de greffe des CSH. Ils montrent que les ostéoclastes sont nécessaires à la différenciation des ostéoblastes et de ce fait, à la maintenance des CSH (Mansour et al., 2012). Il apparaît également que les ostéoclastes contribuent à la niche en l'approvisionnant en oxygène et en nutriments et notamment en calcium, important dans la maintenance des CSH (Adams et al., 2006).

D'autres types de cellules ont un rôle dans le maintien des CSH, notamment les adipocytes, les cellules réticulaires, les cellules musculaires lisses, les cellules T qui permettent de créer un environnement d'immunité spécifique à la niche et les osteomacs, macrophages présents dans l'endosteum (Krause et al., 2013) (Naveiras et al., 2009) (Fujisaki et al., 2011) (Winkler et al., 2010). Ces derniers régulent la fonction des ostéoblastes. La perte des osteomacs induit une diminution du nombre d'ostéoblastes et des cytokines comme Ang-1, KIT et CXCL12 ainsi qu'une mobilisation des CSH (Winkler et al., 2010).

La niche hématopoïétique est en étroite collaboration avec le système nerveux. Des fibres neuronales du système nerveux sympathique présentes dans la moelle

osseuse contrôlent la formation de l'os. Une activité nerveuse a été observée dans la niche endostéale (Frenette and Weiss, 2000). Les cellules nerveuses de Swann produisent du sulfatide capable de mobiliser les CSH de la moelle osseuse. Des souris déficientes pour cette molécule ont une diminution de la mobilisation des CSH en réponse à un stress prolifératif comme celui induit par le G-CSF, due à un défaut de régulation des ostéoblastes par le système nerveux (Katayama et al., 2006).

b. *La niche vasculaire*

De nombreuses cellules LSK-CD150⁺ ont été observées attachées aux cellules endothéliales sinusoidales de la moelle osseuse (Kiel et al., 2005). Au stade embryonnaire, en absence de cellules de la niche endostéale comme les ostéoblastes, les premières CSH prennent place dans des organes hautement vascularisés comme le foie et la rate montrant l'importance des cellules endothéliales dans le maintien des CSH (Cumano and Godin, 2007). Cependant, bien que la moelle osseuse soit riche en vaisseaux sanguins, la niche vasculaire n'est pas suffisante pour maintenir des LT-CSH, car en absence d'ostéoblaste, il se forme une hématopoïèse extra-médullaire.

La niche vasculaire est donc formée d'un réseau de cellules endothéliales sinusoidales. Ces cellules forment une architecture permettant le transit des CSH entre la niche et la circulation. D'autres cellules composent la niche vasculaire, notamment les cellules réticulaires qui sont localisées autour des sinusoides. Ces cellules sont importantes dans le homing et la localisation des CSH dans la moelle osseuse. Elles sont hautement productrice de la chimiokine CXCL12 (également appelée SDF1, Stroma Derived Factor 1) et sont appelées CAR (CXCL12 Abundant Reticular Cell) (Sugiyama et al., 2006). Une perte des cellules CAR entraîne une diminution du nombre de CSH actives. En effet, ces cellules permettent la production de cytokines importantes comme le SCF qui seront détaillées dans un prochain paragraphe (Omatsu et al., 2010). Les cellules mésenchymateuses sont d'autres cellules de la niche vasculaires. Elles sont caractérisées par le marqueur CD146 et se trouvent au niveau sub-endothélial des sinusoides (Sacchetti et al., 2007). Ces

cellules produisent aussi des cytokines et des molécules nécessaires au maintien et à la fonction des CSH. Des expériences de co-culture de CSH sur des cellules endothéliales ou mésenchymateuses CD146 permettent une expansion des cellules *in vitro* (Kiel and Morrison, 2008) (Sacchetti et al., 2007). Il apparaît de plus en plus que la niche vasculaire permet le maintien des CSH au même titre que la niche endostéale en produisant des molécules importantes dans la maintenance des CSH telles que le SCF ou la E-sélectine (Ding et al., 2012) (Winkler et al., 2012). Ces données montrent que la niche vasculaire est également importante pour la dormance et l'auto-renouvellement des CSH.

Un modèle a été proposé pour expliquer l'utilisation de ces deux microenvironnements. Les CSH quiescentes et capables d'auto-renouvellement se trouvent au niveau des deux niches. Lors d'une mobilisation due à un stress hématopoïétique ou pour l'homéostasie du tissu, les CSH de la niche endostéale se détachent et migrent vers la niche vasculaire où elles peuvent se diviser (Figure 3). Une étude plus récente utilisant des souris déficientes pour CXCL12 spécifiquement dans ostéoblastes ou dans les cellules endothéliales montre que les CSH se trouvent au niveau de la niche vasculaire et les progéniteurs lymphoïdes au niveau de la niche endostéale (Ding and Morrison, 2013).

Les deux niches coopèrent pour maintenir les CSH quiescentes, garder leur activité d'auto-renouvellement et permettre la production des progéniteurs et ainsi maintenir l'homéostasie ou répondre à un stress.

c. Mobilisation des CSH

Les CSH sont des cellules très mobiles. En réponse à certains signaux elles peuvent quitter ou revenir coloniser la niche endostéale, ces deux mouvements s'appellent respectivement mobilisation et « homing » (Papayannopoulou, 2003) (Lapidot et al., 2005) (Cancelas et al., 2005).

Des CSH sont libérées de façon constante dans la circulation (Goodman and Hodgson, 1962) et entretiennent un flux ininterrompu entre la moelle osseuse et le sang pendant l'homéostasie. Le rôle de ces CSH circulantes n'est pas très clair mais elles permettent de garder un stock de cellules rapidement accessible pour repeupler

la moelle osseuse après un stress (Wright et al., 2001). Une autre hypothèse est que cette libération serait une conséquence du remodelage constant de l'os qui modifie la niche endostéale (Lévesque et al., 2010).

Le système nerveux sympathique est important dans la mobilisation des CSH. Comme discuté précédemment, la moelle osseuse et notamment la niche endostéale sont fortement innervées. Il a été observé que le nombre de CSH circulantes qui dépend de l'expression de CXCL12 varie en fonction du cycle circadien (Méndez-Ferrer et al., 2008). Le système nerveux sympathique, via la norépinephrine et les récepteurs β -adrénergiques, est responsable du cycle circadien. De façon intéressante, les β -adrénergiques sont exprimés sur les cellules stromales de la moelle osseuse et vont réguler négativement la production de CXCL12, important dans le maintien des CSH dans la niche. Ainsi il apparaît, que le système nerveux régule la mobilisation des CSH lors de l'homéostasie.

En réponse à un traitement induisant la prolifération des CSH et des progéniteurs, une mobilisation massive des CSH a lieu. Le facteur mobilisateur le plus connu et le plus utilisé en clinique est le G-CSF (Granulocyte Colony Stimulating Factor). Ce traitement permet une réduction transitoire de CXCL12 ainsi qu'une induction de protéases par les neutrophiles qui vont cliver les molécules permettant le maintien des CSH dans la niche comme le SCF membranaire et VCAM (Lapidot and Petit, 2002). De plus, le système nerveux sympathique va produire de la norépinephrine qui affecte morphologiquement les ostéoblastes et leur capacité à maintenir les CSH dans la niche (Brouard et al., 2010).

Le recrutement des CSH de la circulation vers la niche vasculaire puis endostéale s'appelle le « homing » et a lieu notamment lors d'une transplantation (Nilsson and Simmons, 2004). Cette colonisation des CSH dans leur niche s'accompagne d'une prolifération des CSH et de la génération de progéniteurs et de cellules différenciées (Wilson and Trumpp, 2006). Comme il sera discuté plus tard, les cellules de la niche sécrètent et expriment de nombreuses molécules. Par exemple, les cellules

endothéliales vasculaires sécrètent des chimiokines comme CXCL12 et expriment les intégrines VCAM et E-selectine importantes dans la mobilisation et le homing des CSH (Sipkins et al., 2005) (Avecilla et al., 2004). Ainsi, il a été observé qu'après des traitements myelosuppressifs, la moelle osseuse induit un signal qui permet le recrutement des CSH dans la circulation vers la niche endostéale (Jiang et al., 2009).

d. *Les régulateurs*

De nombreux facteurs ont été mis en évidence pour leur rôle dans la balance entre la dormance, la prolifération, l'auto-renouvellement et la survie des CSH. La plupart des facteurs extrinsèques sont produits par les cellules de la niche et notamment les ostéoblastes (Figure 4, Tableau 3) (Taichman and Emerson, 1998) (Calvi et al., 2003). Il existe également de nombreux facteurs intrinsèques à la CSH (Figure 5, Tableau 3).

L'échange important entre la niche et les CSH est nécessaire pour de nombreuses fonctions telles que la migration ou l'adhésion, le maintien en quiescence ou la prolifération. De nombreuses molécules et voies de signalisation sont impliquées dans cet échange, aussi bien des cadhérines, des intégrines, des chimiokines, des cytokines et des molécules de signalisation ainsi que leurs récepteurs (Figure 4).

Tie2 et Angiopoïétine 1 sont exprimés sur les LT-CSH et sur les ostéoblastes de la niche respectivement. Ils activent la voie des β -intégrines et des N-cadhérines dans les CSH ce qui permet l'interaction des CSH avec les cellules de la niche. Cette interaction permet le maintien en dormance et la survie des CSH en empêchant la division cellulaire notamment via la voie PI3K/Akt et en régulant positivement l'inhibiteur des CDK, p21 (Arai et al., 2004). Il a été observé que le couple Tie2 et Ang n'est pas nécessaire pour la régulation des CSH dans la mise en place de l'hématopoïèse foetale mais est nécessaire pour leur maintien dans la niche (Puri and Bernstein, 2003).

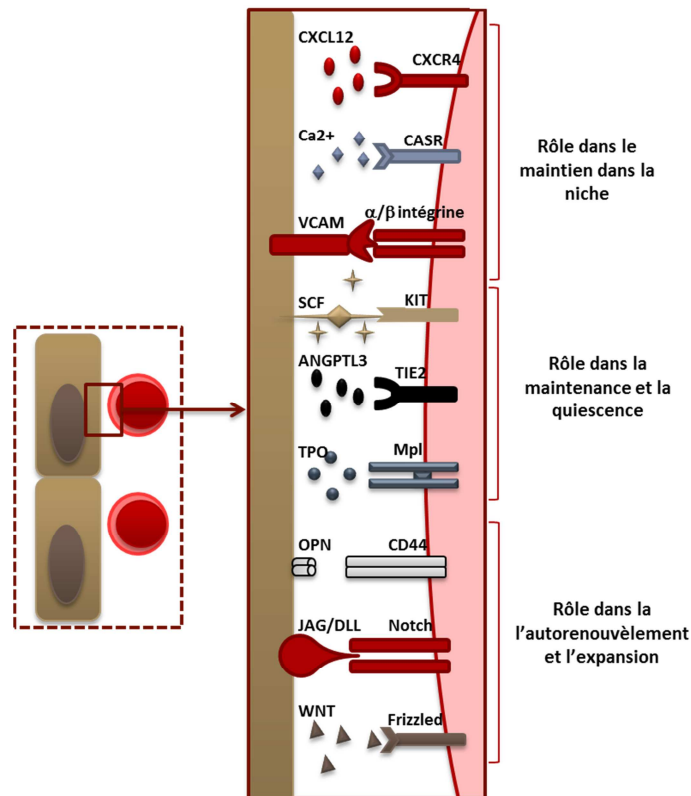


Figure 4 : Interactions entre la CSH et la niche endostéale

Les ostéoblastes de la niche produisent de nombreuses molécules qui vont être captées par les CSH et qui vont les maintenir en état quiescent et contrôler l'autorenouveau.

TPO et Mpl sont des facteurs clés de la maintenance des CSH. La signalisation de ce couple cytokine/récepteur sera discutée dans le chapitre suivant. Une déficience pour l'une de ces protéines entraîne une diminution drastique du nombre de CSH et de leur capacité de reconstitution (Qian et al., 2007) (Kimura et al., 1998). Les LT-CSH exprimant Mpl sont en contact avec les cellules ostéoblastiques productrices de TPO et ont un statut quiescent. L'inhibition de l'interaction entre la TPO et Mpl par des anticorps bloquant induit une diminution du nombre de CSH quiescentes tandis que l'injection de TPO augmente l'expression de p57 qui est spécifiquement exprimé par les CSH quiescentes (Yoshihara et al., 2007) (Arai et al., 2009).

SCF et KIT : Le récepteur KIT est exprimé fortement sur toutes les CSH. Il peut fixer du SCF membranaire produit par les ostéoblastes de la niche. Le SCF membranaire a une plus grande capacité d'activation de KIT que le SCF soluble (Lyman and

Jacobsen, 1998) (Miyazawa et al., 1995). Une mutation du récepteur KIT ou l'utilisation d'anticorps bloquants qui empêchent l'interaction entre le SCF et KIT, affectent la migration et la différenciation des CSH (Kiel and Morrison, 2006) (Barker, 1994). Ce système n'est pas essentiel pour la génération et l'expansion des CSH mais est indispensable pour le maintien des CSH à long terme en agissant sur l'auto-renouvellement et la quiescence (Thorén et al., 2008).

Les N-Cadhérines et les β 1-intégrines semblent nécessaires au maintien des CSH dans la niche et à la régulation de la prolifération. Une augmentation de l'expression des N-cadhérines dans des cellules stromales induit une augmentation de leur capacité à maintenir les CSH *in vitro*. De plus, les N-Cadherines permettent d'augmenter l'interaction des CSH avec la niche lors d'une transplantation (Hosokawa et al., 2010). Tie2/Ang1 comme TPO/Mpl permettent l'expression des N-Cadhérines et des β 1-intégrines à la surface des CSH (Yoshihara et al., 2007) (Arai et al., 2004). Les composants de la matrice cellulaire ont un rôle dans le maintien des CSH dans la niche mais permettent aussi de réguler leur quiescence. Cependant, ces résultats sont controversés puisque les souris déficientes pour les N-cadhérines ne présentent pas de défauts majeurs d'hématopoïèse (Kiel et al., 2009).

CXCL12 (SDF1) est une chimiokine produite par les cellules des niches vasculaires et endostéales, et qui interagit avec le récepteur CXCR4 de la CSH. CXCL12 permet l'induction du gène *p57*, important dans le maintien de la quiescence (Matsumoto et al., 2011). En réponse à un stress prolifératif comme l'irradiation, les cellules de la niche augmentent la production de CXCL12. Ainsi lors d'une transplantation, les CSH migrent de façon aléatoire dans la moelle osseuse de souris non irradiées alors qu'elles se positionnent de façon spécifique dans la zone trabéculaire de l'os au niveau de la niche endostéale des souris receveuses irradiées (Xie et al., 2009). De plus, les souris déficientes pour CXCR4 ou CXCL12 sont incapables de maintenir les CSH dans la niche et celles-ci sont moins quiescentes (Tzeng et al., 2011). Ce couple chimiokine-récepteur est important dans le recrutement des CSH du sang vers la niche endostéale lors d'expérience de reconstitution (Wright et al., 2002). Deux études récentes évaluent l'impact de la production de CXCL12 dans les

différents types de cellules de la niche sur la maintenance des CSH. Pour cela, les auteurs utilisent des souris n'exprimant plus CXCL12 dans différents types de cellules de la niche suite à des KO conditionnels. Ils montrent que CXCL12 produit par les progéniteurs de l'os, contrairement aux ostéoblastes ou aux cellules endothéliales, est nécessaire pour éviter la mobilisation des CSH (Greenbaum et al., 2013)(Ding and Morrison, 2013).

L'Ostéopontin est une glycoprotéine de la matrice extracellulaire qui interagit avec les intégrines. Elle est exprimée sur les ostéoblastes et régule négativement le nombre de CSH dans la niche (Denhardt and Guo, 1993). Une déficience d'ostéopontine entraîne une augmentation du nombre de CSH dans la niche (Nilsson et al., 2005) (Stier et al., 2005). De plus des cellules sauvages ont un défaut de reconstitution dans un environnement déficient en osteopontine.

La voie Wnt/ β -caténine a un rôle essentiel, bien que controversé, dans la prolifération, la mobilisation, la polarité et la maintenance des CSH. La β -caténine est un facteur en aval du récepteur Frizzled et de son ligand Wnt. Une activation constitutive de la β -caténine diminue la quiescence et bloque la différenciation des CSH (Scheller et al., 2006). L'inhibition de la voie Wnt par l'inhibiteur Dickkopf induit la prolifération des CSH et diminue leur capacité de régénération ce qui suggère que la voie Wnt dans la niche limite la prolifération des CSH et préserve leur capacité d'auto-renouvellement (Fleming et al., 2008).

Le calcium (Ca^{2+}) permet le maintien des CSH dans la niche. Le calcium est enrichi au niveau de la zone endostéale, et les CSH expriment de nombreux récepteurs au calcium (Adams et al., 2006). Dans un contexte sans calcium, les CSH sont incapables de reconstituer la moelle par un défaut d'interaction avec les cellules de la niche (Lympéri et al., 2011).

Notch est présent sur les CSH et est impliqué dans de nombreuses décisions de la cellule et a notamment un rôle dans la maintenance, l'auto-renouvellement et l'expansion clonale des CSH. Le ligand de Notch, Jagged-1 est exprimé par les ostéoblastes de la niche (Radtko et al., 2004). *In vitro*, l'activation de Notch inhibe la différenciation et augmente l'auto-renouvellement des CSH (Varnum-Finney et al., 2000). Cependant son rôle est controversé puisque la délétion de Notch dans un modèle murin n'a aucun effet sur les CSH (Maillard et al., 2008). Ainsi, il apparaît que la voie Notch n'est pas nécessaire pour la maintenance des CSH mais importante pour contrôler la différenciation et l'auto-renouvellement dans des conditions de stress (Varnum-Finney et al., 2011).

Hedgehog est le seul régulateur négatif de la maintenance des CSH produit par la niche. Il se fixe sur son récepteur Patched présent sur les CSH pour l'inhiber. Une sur-activation de la voie Hedgehog entraîne une augmentation du nombre de CSH associée à un défaut de leur fonction. Il est donc un régulateur négatif de la quiescence des CSH (Bhardwaj et al., 2001).

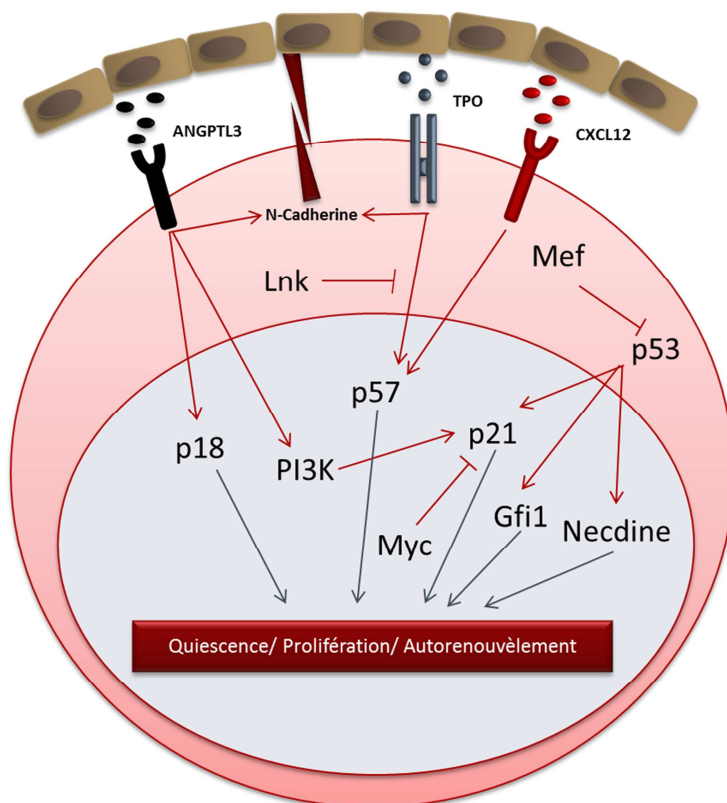


Figure 5 : Voies moléculaires entre la niche et la CSH

Les décisions de la CSH résultent d'un échange important entre les molécules de la niche et de la CSH ainsi que de nombreux facteurs intrinsèques à la cellule.

II. La signalisation Thrombopoïétine

A. Les cytokines et leur récepteurs

Les cytokines sont une grande famille de ligands extracellulaires qui peuvent entraîner une réponse biologique en se liant à leurs récepteurs présents à la membrane des cellules et en les activant. Le récepteur passe ainsi d'un état basal à un état activé qui va induire un signal via une cascade d'évènements de phosphorylation. Elles régulent ainsi différents aspects de l'hématopoïèse (Figure 1). Chaque cytokine a de multiples actions qui passent par un récepteur qui leur est spécifique. Leurs actions peuvent être aussi bien des réponses de survie, de prolifération, de différenciation, de maturation et d'activation de fonction. Elles peuvent agir sur un seul lignage hématopoïétique, avoir différentes actions sur plusieurs lignages ou encore agir de façon séquentielle sur un lignage (Robb, 2007).

Il y a environ soixante cytokines et facteurs de croissance dans le système hématopoïétique qui se présentent sous la forme de molécules solubles ou sous la forme de ligands membranaires, et qui régulent le système hématopoïétique.

La première cytokine identifiée est l'érythropoïétine (EPO). Elle a été découverte comme un activateur de la production de globules rouges (Miyake et al., 1977). Ceci a montré l'existence de régulateurs des cellules sanguines. Puis, d'autres facteurs de croissance ont été identifiés et purifiés comme les interleukines (IL), les facteurs de stimulation de colonies (CSF), les interférons (IFN) et la thrombopoïétine (TPO), sur la base de leur capacité à former des colonies hématopoïétiques *in vitro* à partir de progéniteurs. L'analyse de souris génétiquement modifiées a ensuite permis de confirmer ces fonctions et a également mis en évidence de nouveaux rôles spécifiques à chaque cytokine (Metcalf, 2008).

La production des cytokines se fait dans des tissus non hématopoïétiques, par exemple l'EPO est produite par les reins (Naets, 1960), la TPO en majorité par le foie (Nomura et al., 1997), les CSFs, IL5, ou l'IL6 sont produites par de multiples tissus (Metcalf et al., 1995), (Brown et al., 1994), (Ryan et al., 2001). Dans le sérum, la

production de cytokine est généralement faible, après un stress hématopoïétique, elle peut augmenter de près de mille fois (Metcalf et al., 1995).

Les récepteurs à cytokines forment aussi une famille bien conservée. Sous forme inactive, ils se présentent sous la forme d'un monomère avec une partie extracellulaire qui reconnaît un ligand spécifique et une partie intracellulaire qui permet l'activation de voies de signalisation (Figure 6). Après fixation du ligand, le récepteur se dimérise ou change de conformation ce qui va permettre l'activation d'un dimère déjà formé. La dimérisation peut se faire de façon homo-dimérique ou hétéro-dimérique. Dans ce cas-là, il est composé d'une partie qui va permettre la signalisation et d'une deuxième partie qui peut fixer le ligand (Robb, 2007).

Les récepteurs peuvent se classer selon deux critères. Le premier les distingue selon la présence d'un domaine à activité kinase intrinsèque et leur capacité à s'activer eux-mêmes. Ces récepteurs sont appelés récepteurs à tyrosine kinase (c'est le cas du Flt-3 et de KIT). Ceux qui ne possèdent pas ce domaine sont nommés récepteurs à cytokine (Mpl, IFN-R, R-EPO). Dans ce cas, une kinase leur est pré-associée.

La deuxième façon de classer les récepteurs est fondée sur la présence de motifs consensus (Robb, 2007). Ainsi, les récepteurs de classe I comme TPO-R, R-EPO, G-CSF-R ou encore la plupart des interleukines se caractérisent par la présence (Figure 6) :

- dans le domaine extracellulaire de quatre résidus cystéines, d'un motif tryptophane-serine-X-serine-tryptophane (WSXWS), important pour la fixation du ligand puisqu'une mutation dans ce domaine entraîne un défaut de fixation. Deux domaines fibronectine de type III sont également présents entre lesquels se trouvent de nombreux sites de glycosylation. Ils sont importants dans la maturation et la stabilisation du récepteur.

- dans le domaine intracellulaire d'une région appelée Box1, riche en proline et d'une région appelée Box2, riche en acide aminé

hydrophobes. Le reste de la partie intracellulaire est spécifique aux récepteurs et va permettre l'activation de signaux variés.

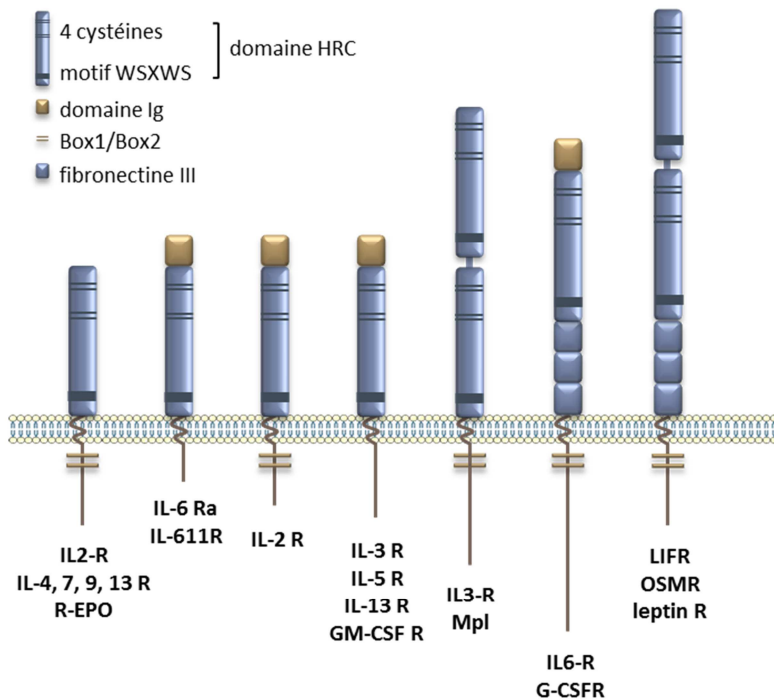


Figure 6 : Les récepteurs de classe I

Les récepteurs de type I sont composés de deux domaines fibonectine de type III. Dans l'un des domaines se trouve 4 cystéines consensus et dans l'autre le motif WSXWS caractéristique des récepteurs à cytokine. Certains récepteurs possèdent deux fois cette structures (Mpl, leptin R), d'autres contiennent des domaines immunoglobuline (IL6-R, GM-CSF-R) ou fibronectine III supplémentaires (G-SCF-R, IL6-R).

Les récepteurs de types II ont également la région Box1/Box2 mais ont perdu le motif WSXWS. Ils regroupent les récepteurs aux interférons et le récepteur de l'IL10.

B. La Thrombopoïétine et Mpl

1. Mpl

Mpl a été découvert en 1986 grâce au virus leucémogène MPL-V issu du F-MLV (Friend Murine Leukemia Virus) capable d'induire un syndrome myéloprolifératif chez



Le gène c-mpl est composé de 12 exons, le premier exon code pour le peptide signal, puis les 8 suivants codent pour la partie cytoplasmique qui est composée de deux domaines communs aux récepteurs à cytokines. L'exon 10 code pour la partie transmembranaire et les deux derniers exons pour la partie intracellulaire.

SP : peptide signal ; RHC : domaine d'homologie des récepteurs à cytokine, composé de deux domaines de fibronectine des type III, 4 cystéines consensus, et le motif WSXWS ; TM : domaine transmembranaire

Page 28 —

d'une forme soluble putative et l'isoforme Mpl-K donne une forme tronquée à laquelle il manque une partie du domaine cytoplasmique. Seule l'isoforme Mpl-P induit une signalisation en réponse à la TPO.

Le promoteur de Mpl contient des séquences consensus pour les facteurs de transcription GATA et Ets, impliqués dans le contrôle des gènes spécifiques de la megacaryopoïèse (Deveaux et al., 1996). *c-mpl* est exprimé dans les cellules endothéliales (Cardier and Dempsey, 1998) et dans les tissus hématopoïétiques tels que la moelle osseuse, le foie fœtal et la rate, avec une forte expression au niveau de cellules spécifiques : les CSH, les progéniteurs myéloïdes, les mégacaryocytes ainsi que les plaquettes (Figure 8). En effet, il a été observé que 70 % des LSK murins ou des CD34⁺CD38⁻ humains expriment Mpl (Wendling and Vainchenker, 1998), 96 % des cellules LT-CSH (LSK-CD48⁻CD150⁺) expriment Mpl (Yoshihara et al., 2007).

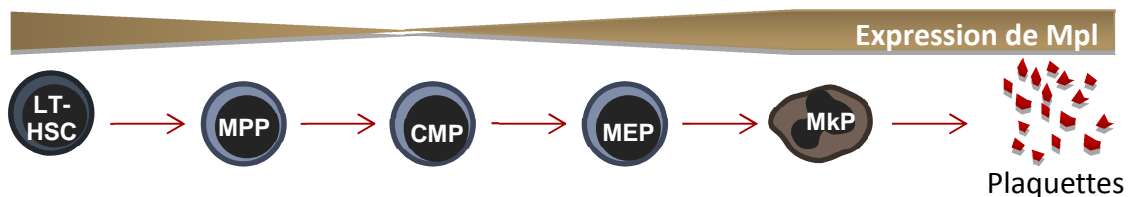
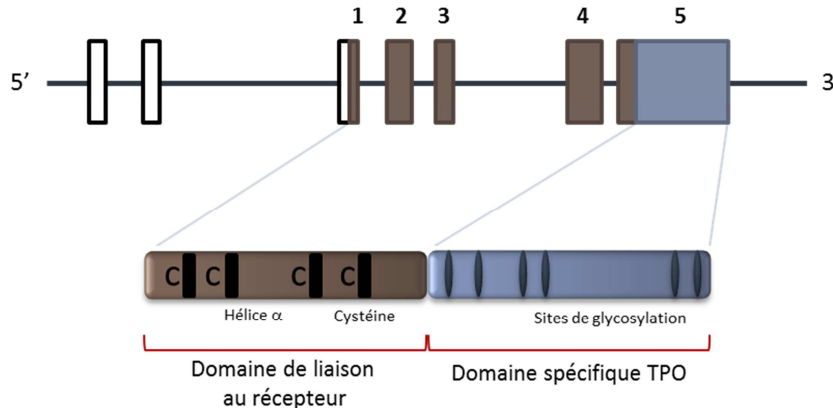


Figure 8 : Expression de Mpl dans le système hématopoïétique

Chez l'homme, la partie extracellulaire de Mpl est constituée d'une région de 463 acides aminés et contient deux motifs WSXWS. La partie transmembranaire contient 22 acides aminés. La partie cytoplasmique du récepteur Mpl se compose de 122 acides aminés très conservés selon les espèces ; elle contient les Box1 et Box2 nécessaires la signalisation. La Box1 se définit par deux prolines séparées par deux acides aminés et se trouve au niveau des résidus 531 à 534 de Mpl. La Box2 est définie par de nombreux résidus acides et sérine et se trouve en position 559 à 583 de Mpl (Figure 7). Dans la partie cytoplasmique, juste en dessous de la membrane se trouve une région importante et spécifique de Mpl, appelée domaine amphipatique qui contient un motif RWQFP qui commence à la position 514 du Mpl humain. Ce domaine est essentiel au maintien de Mpl sous forme inactive. En effet, une mutation ou une délétion de ce motif entraîne une dimerisation spontanée de Mpl (Staerk et al., 2006).



sur le récepteur. Elle contient quatre hélices alpha, qui vont donner à la TPO sa conformation et sa stabilité, importantes dans la reconnaissance du récepteur. Plusieurs équipes ont montré que cette partie est suffisante pour activer pleinement Mpl et promouvoir la mégacaryopoïèse (Bartley et al., 1994) (Lok et al., 1994) (De Sauvage et al., 1994).

- La partie C-terminale est composée de 179 acides aminés et est spécifique à la TPO ; elle ne présente aucune homologie avec d'autres cytokines. Cette partie est riche en sérine, thréonine et proline et possède de nombreux sites de glycosylation. Ce site est bien conservé entre les espèces (74% d'homologie) ce qui suggère une fonction physiologique importante pour ce domaine. Ainsi, il permettrait la stabilisation et la sécrétion de la protéine (Linden and Kaushansky, 2000). Après glycosylation, la taille de la TPO passe de 35 kDa à 70 kDa.

Différents sites de production de la TPO ont été mis en évidence mais les sources principales sont le foie et dans une moindre mesure, les reins (Sungaran et al., 1997). Considérée comme une hormone, la TPO circule dans le sang avec une durée de vie de 20 à 30 heures. Plus récemment il a été mis en évidence une production locale de la TPO par les ostéoblastes de la niche endostéale (Yoshihara et al., 2007).

Des études de la régulation de la TPO ont été réalisées à différents niveaux mais seule sa dégradation semble agir sur la quantité de TPO circulante. Il a été observé que la production de TPO par le foie est constitutive (McCarty et al., 1995). L'expression de la TPO reste stable dans le foie mais est augmentée dans les cellules stromales de la moelle osseuse d'animaux thrombocytopéniques (Sungaran et al., 1997). Une boucle de rétrocontrôle a été mise en évidence pour réguler la quantité de TPO dans la circulation. Sa concentration est contrôlée par la quantité de plaquettes et de mégacaryocytes. La fixation de la TPO sur Mpl entraîne l'internalisation et la dégradation du ligand (Dahlen et al., 2003). Ainsi plus le nombre de plaquettes est élevé moins il y a de TPO dans la circulation. Les souris déficientes pour Mpl ont moins de mégacaryocytes et de plaquettes et inversement une quantité

importante de TPO dans le sang (Gurney et al., 1994) (Murone et al., 1998). De plus, des patients thrombocytopéniques suite à une chimiothérapie ont un niveau de TPO élevé et qui diminue lorsque le nombre de plaquettes redevient normal (Folman et al., 2001).

Certain patients atteints de thrombocythémie essentielle font exception à cette règle. Ces patients possèdent une mutation gain de fonction du gène *tpo*. Cette mutation se trouve au niveau d'un site d'épissage alternatif et donne lieu à un ARNm plus efficacement traduit (Wiestner et al., 1998). D'autres mutations dans la région 5'-UTR qui est une région de régulation de la transcription du gène, ont été décrites (Ghilardi et al., 1999). Les patients présentant ces différentes mutations ont une surproduction de TPO et un nombre élevé de plaquettes.

L'utilisation de la TPO en clinique s'est avéré un échec dans le traitement des thrombocytopénies. L'injection de TPO cause des problèmes d'immunogénicité par la production d'auto-anticorps (Basser et al., 2002). Plusieurs analogues de la TPO ont été développés et notamment l'Eltrombopag et la Romiplostim. Tous deux permettent d'activer Mpl et les voies de signalisation sous-jacentes sans entrer en compétition avec la TPO. Ces molécules diffèrent par leur structure : l'Eltrombopag est une molécule chimique et la Romiplostim est une protéine fusion avec un domaine Fc (fragment cristallisable) sans homologie avec la TPO (Wang et al., 2004) (Cheng, 2012).

C. Rôle dans la mégacaryopoïèse

Les plaquettes sont responsables de l'hémostase et sont des fragments cytoplasmiques issus des mégacaryocytes de la moelle osseuse (Figure 10). Chaque jour, un adulte produit 1.10^{11} plaquettes et ce nombre reste constant tout au long de la vie. Lors de conditions de stress, le nombre de plaquettes peut augmenter de près de 10 fois (Geddis et al., 2002).

Les premières expériences réalisées avec de la TPO seule ou avec d'autres cytokines ont montré une croissance des progéniteurs mégacaryocytaires dans des milieux semi-solides et des cultures liquides (Broudy et al., 1995) (Kaushansky et al., 1994) (Zeigler et al., 1994). L'injection de TPO dans des primates induit une thrombocytose (Harker et al., 1996). A l'inverse, les souris TPO^{-/-} ou Mpl^{-/-} présentent une thrombocytopénie sévère, avec un nombre de plaquettes de 5 à 10% comparé à des souris sauvages, liée à un nombre réduit de mégacaryocytes (Gurney et al., 1994) (De Sauvage et al., 1996) (Alexander et al., 1996).

Ainsi, le premier rôle de la TPO est de réguler la mégacaryopoïèse et la production plaquettaire. La TPO agit comme un stimulateur de la prolifération et de la différenciation des mégacaryocytes en augmentant leur ploïdie (Choi et al., 1995). La TPO induit également l'expression de protéines spécifiques à la surface des mégacaryocytes tel que le platelet factor 4, le facteur de von Willebrand, les glycoprotéines Ib et IIb/IIIa et certains récepteurs aux intégrines. Pour ces derniers, la TPO améliore également leur capacité à fixer leurs ligands (Zauli et al., 1997).

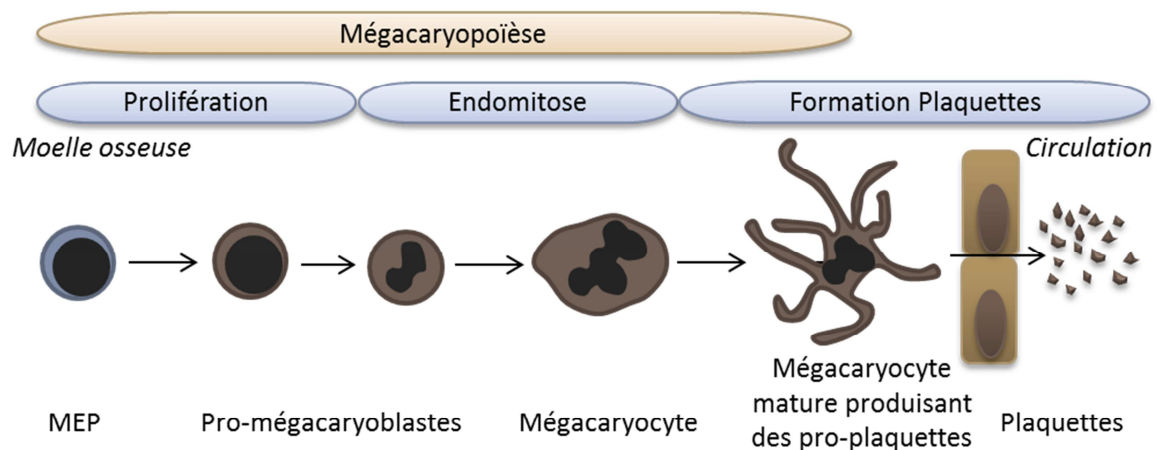


Figure 10 : Schéma de la mégacaryopoïèse

Les progéniteurs myéloïdes se différencient en pro-mégacaryocytes qui vont passer par des étapes de divisions et d'endomitoses aboutissant à des cellules polyploïdiques appelées mégacaryocytes. Des membranes de démarcation dénomées pro-plaquettes se forment au niveau des mégacaryocytes matures, puis s'en détachent afin de donner des fragements anucléés, les plaquettes.

D. Rôle dans les CSH

L'analyse des souris déficientes pour *c-mpl* ou pour la TPO montre qu'en plus d'être un régulateur de la lignée mégacaryocytaire, la TPO a un rôle spécifique sur l'activité des CSH et notamment sur leur quiescence. En effet, les souris TPO^{-/-} et Mpl^{-/-} ont une diminution du nombre de CSH et de progéniteurs myéloïdes en vieillissant aboutissant à une pancytopenie modérée dans le sang. Ce phénotype est dû à une augmentation de la prolifération des CSH (Qian et al., 2007).

Comme discuté dans la première partie, il a été montré que la TPO permet le maintien des CSH dans la niche (Yoshihara et al., 2007). Les CSH de souris sauvages exprimant Mpl sont plus quiescentes que les CSH qui ne l'ont pas. Les récepteurs Mpl présents sur les CSH se fixent au niveau des cellules ostéoblastiques productrices de TPO et permet leur maintien dans la niche ainsi que la mise en place de voies de signalisation impliquées dans la maintenance des CSH. Une inhibition de cette interaction diminue la quiescence des CSH alors que l'injection de TPO augmente la quiescence des cellules (Yoshihara et al., 2007). La signalisation TPO permet la régulation de différents gènes importants dans la quiescence des CSH comme *p21*, *p57*, *Tie2* ou *c-myc* ainsi que dans l'adhésion des CSH avec la niche comme les β -intégrines (Yoshihara et al., 2007) (Qian et al., 2007). Par cette dernière, la TPO a également un rôle dans le homing et la mobilisation des CSH.

Depuis de nombreuses années, des expériences *in vitro* ont mis en évidence le rôle de la TPO dans la survie des CSH. La TPO, en synergie avec d'autres cytokines comme le Flt-3, l'IL3 et le SCF, permet aussi la prolifération des CSH et des progéniteurs primitifs murins et humains (Kobayashi et al., 1996) (Sitnicka et al., 1996) (Ema et al., 2000). De plus, la TPO a également un rôle dans la prolifération des progéniteurs erythroïdes (Broudy et al., 1995).

Les souris déficientes pour TPO ou Mpl ont un défaut d'expansion après transplantation dans des souris receveuses sauvages irradiées de façon létale (Solar et al., 1998) (Kimura et al., 1998) (Qian et al., 2007). Quatre fois plus de cellules

sauvages sont nécessaires pour reconstituer des souris receveuses TPO^{-/-} comparé à des hôtes sauvages. Ces résultats montrent que la TPO est nécessaire à l'expansion et l'autorenouvellement des CSH après transplantation (Fox et al., 2002). De plus l'injection de TPO permet une meilleure reconstitution des cellules primitives CD34⁺ humaines dans des souris NOD/SCID (Verstegen et al., 2003).

Finalement, plusieurs études ont observé un rôle de TPO dans le recouvrement de la moelle osseuse après des traitements myélosuppressifs pré-transplantation comme les irradiations, les chimiothérapies. L'injection de TPO à des souris avant ou rapidement après des irradiations de 7 à 10 Gy permet d'augmenter la production des progéniteurs de la moelle osseuse et des cellules matures dans le sang. En cas de myéloablation, l'injection de TPO permet une meilleure survie des animaux traités par la TPO, en inhibant une réponse apoptotique dépendante de p53 des progéniteurs multipotents et des progéniteurs mégacaryocytaires (Wagemaker et al., 1998) (Pestina et al., 2001) (Stefanich et al., 2001) (Mouthon et al., 2002). Le timing d'injection de TPO est important et elle doit se faire juste avant ou juste après le traitement car une injection sept jours avant et 24h après n'ont aucun effet. (Stefanich et al., 2001) (Mouthon et al., 2002).

Une hypothèse a été proposée sur les différents rôles de la TPO sur les CSH. La TPO serait un senseur pour connaître la nécessité des CSH de se différencier. Lors d'une myélosuppression, peu de plaquettes circulent dans le sang et donc la quantité de TPO circulante est importante. De façon parallèle, l'injection de TPO augmente sa quantité dans le sang. Ceci serait un signal pour la prolifération et la différenciation des CSH dans la moelle osseuse (Lilly et al., 2011).

E. Les voies de signalisation induites par la TPO

Le récepteur Mpl fait parti des récepteurs de Classe I et ne contient pas d'activité kinase intrinsèque. La fixation de la TPO sur Mpl entraine un changement de

conformation du récepteur suivi de sa dimérisation (Figure 11). Les protéines kinases Jak2 et Tyk2 fixées au monomère vont être rapprochées, et s'activer par transphosphorylation puis phosphoryler des résidus tyrosines spécifiques du récepteur. Ces résidus vont servir de plateformes pour les protéines de signalisation possédant un domaine SH2 (Src homology 2) ou SHC (Src Homology domain 2 Containing). Ces molécules vont induire notamment les voies de signalisation Jak/STAT, PI3K/Akt et ERK/MAPK menant à la transcription de gènes impliqués dans la régulation du cycle cellulaire et de la survie (Figure 12) (Dorsch et al., 1995) (Drachman et al., 1995) (Rojnuckarin et al., 1999) (Geddis et al., 2001). Cette activation doit être transitoire, pour cela, la fixation du ligand induit également des signaux d'inactivation de la voie par induction de protéines inhibitrices ou par l'inactivation du récepteur.

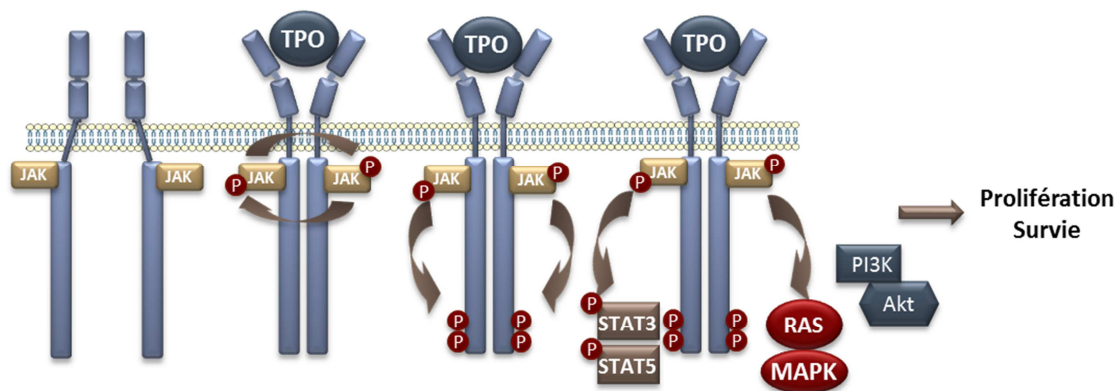


Figure 11 : Modèle d'activation de Mpl

Lors de la fixation du ligand TPO, le récepteur Mpl se dimérise ce qui active les protéines de signalisation Jak. Celles-ci vont phosphoryler les tyrosines Y112 et Y117. Elles vont servir de plateforme aux différentes voies de signalisation, Jak/STAT, PI3K/Akt et ERK/MAPK. Les signaux induits permettent la survie et la prolifération des cellules.

L'utilisation de récepteur contenant des délétions dans la région cytoplasmique ou des mutations ponctuelles des tyrosines en phénylalanine a permis la mise en évidence des sites importants pour les différentes voies de signalisation. Plusieurs tyrosines de Mpl se sont révélées essentielles : Y522, Y592, Y626 et Y631 (la

numérotation des acides aminés plus couramment utilisée dans la littérature commence à partir du premier acide aminé cytoplasmique et correspond à Y8, Y78, Y112, et Y117. Cette dernière sera utilisée par la suite) (Drachman and Kaushansky, 1997) (Miyakawa et al., 2000).

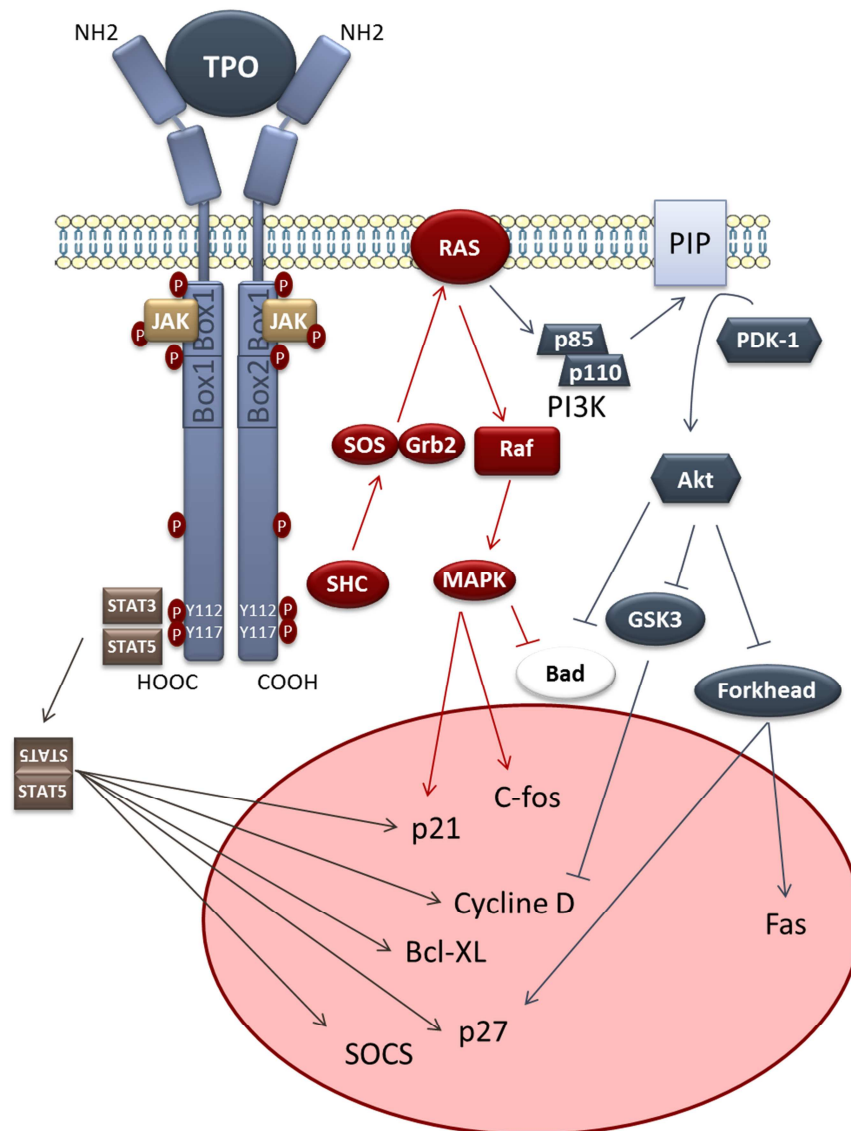


Figure 12 : Signalisation en aval de TPO/Mpl

Les protéines Jak fixées sur la Box1 s'activent par transphosphorylation lors de la dimérisation du récepteur. Elles vont alors phosphoryler différentes tyrosines et notamment Y112 et Y117 qui vont servir de sites de reconnaissance des protéines de la signalisation comme les protéines STAT et la protéine adaptatrice SHC. Cette dernière active alors la protéine RAS qui active d'une part la voie MAPK et d'autre part la voie PI3K.

1. La voie Jak/STAT

La famille des Janus kinases comprend 4 membres : Jak1, Jak2, Jak3 et Tyk2. Ces tyrosines kinases s'associent dans la partie cytoplasmique des récepteurs aux cytokines qui n'ont pas d'activité kinase intrinsèque. Elles se fixent au niveau du site consensus Box1, proche de la membrane cytoplasmique (Figure 12). La mutation de ce site empêche la phosphorylation des Jak induite par les cytokines.

Lors de la liaison du ligand sur son récepteur, celui-ci va se dimériser et rapprocher les protéines Jak qui vont s'activer par auto ou transphosphorylation. Elles sont impliquées dans de nombreuses voies de signalisation des récepteurs de type I (par exemple, de nombreuses interleukines, le GM-CSF, l'EPO et la TPO) et également de type II (pour les interférons α , β , γ). Les souris déficientes pour Jak2 meurent d'une anémie à un stade précoce de gestation. *In vitro*, les cellules hématopoïétiques fœtales de souris déficientes pour Jak2 sont incapables de produire des mégacaryocytes en réponse à la TPO. Ces résultats montrent le rôle important de Jak2 dans la signalisation du récepteur Mpl (Parganas et al., 1998).

Les quatre membres de la famille des Jak se partagent sept domaines similaires nommé JH (Jak homology). JH1 contient le domaine kinase. JH2 est un domaine pseudo-kinase, important dans la régulation du domaine kinase JH1. Les domaines JH4 à JH7 forment le domaine FERM qui est responsable de l'interaction entre Jak avec la Box 1 du récepteur. JH3 et JH4 forment le domaine SH2 (Figure 13) (Watowich et al., 1996)

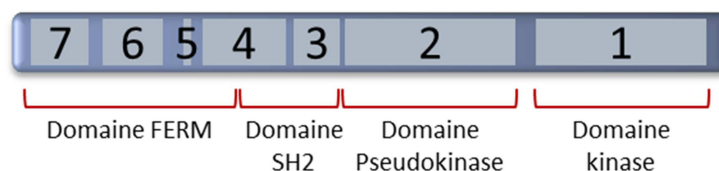


Figure 13 : Organisation structurale des Jak

Les protéines Jak sont organisées en sept domaines Jak homology (JH)

Dans les lignées cellulaires megacaryoblastiques UT-7, MO7e et DAMI exprimant Mpl, la dimérisation du récepteur entraîne l'activation transitoire de Jak2 et Tyk2 (Sattler et al., 1995) (Ezumi et al., 1995). Ces résultats ont ensuite été confirmés sur les plaquettes et mégacaryocytes (Miyakawa et al., 1996). Il a été montré que Jak2 est l'isoforme prédominante dans les mégacaryocytes et que l'activation de Tyk2 n'est pas nécessaire à la signalisation TPO (Drachman et al., 1999). En effet, les progéniteurs des souris déficientes pour Jak2 mais pas pour Tyk2 ne répondent pas à la TPO (Parganas et al., 1998) (Karaghiosoff et al., 2000). Les études des voies de signalisation se sont donc plus portées sur Jak2. Mpl est le seul récepteur homodimérique qui active deux protéines de la famille Jak.

L'activation de Jak entraîne la phosphorylation (Figure 12) :

- du récepteur au niveau des résidus tyrosines Y78, Y112 et Y117 (Drachman and Kaushansky, 1997) (Miyakawa et al., 2000)
- des protéines STAT1, STAT3 et STAT5 qui ont reconnu les résidus précédemment phosphorylés du récepteur via leur domaine SH2 (Pallard et al., 1995) (Nagata and Todokoro, 1995) (Bacon et al., 1995) (Miyakawa et al., 1996).

La famille des STAT (Signal Transducers and Activators of Transcription) inclut sept membres : STAT1, 2, 3, 4, 5 (A et B) et 6 qui sont des cibles des kinases Jak. Ils présentent des motifs conservés comprenant un domaine de liaison à l'ADN, un domaine SH2, un domaine de transactivation et, dans le domaine C-terminal, des sérines et tyrosines phosphorylables conservées. Ces différents facteurs de transcription peuvent être activés en réponse à de nombreuses cytokines, hormones, et facteurs de croissance. Les STAT sont présents dans le cytoplasme sous forme de monomères inactifs. Lorsque le récepteur est activé, les STAT reconnaissent les tyrosines phosphorylées du récepteur via leur domaine SH2 et vont être phosphorylées par Jak. Elles vont ensuite s'homodimériser ou s'hétéro-dimériser, acquérir une capacité de liaison à l'ADN, migrer dans le noyau et réguler la transcription de

nombreux gènes. Les différents multimères de STAT ont une affinité pour l'ADN différentes, ce qui va permettre une hétérogénéité du signal (Murray, 2007).

La TPO induit l'activation de STAT3, STAT5 (5A et 5B) et STAT1 (Pallard et al., 1995) (Ezumi et al., 1995) (Nagata and Todokoro, 1995). STAT3 n'est pas nécessaire à la mégacaryopoïèse mais est indispensable pour l'expansion des progéniteurs mégacaryoblastiques (Kirito and Kaushansky, 2006). Les souris STAT5 (A et B)^{-/-} présentent une thrombocytopénie, montrant le rôle essentiel de ces facteurs dans la production plaquettaire (Snow et al., 2002). Les gènes cibles des STAT en réponse à la TPO comprennent les protéines du cycle cellulaire comme la cycline D1, D2 ou D3, p27, p21 ou des protéines anti-apoptotique comme Bcl-xL (Geddis et al., 2002).

Le rôle de STAT1 en réponse à la TPO est peu étudié. STAT1 est connu pour participer à la signalisation en réponse aux interférons. Il a été montré que l'expression ectopique de l'interféron gamma ou de sa cible IRF1 entraîne une augmentation de la ploïdisation des mégacaryocytes ainsi que de l'expression de gènes importants dans l'endomitose (Tsuji-Takayama et al., 1996) (Huang et al., 2007). De plus, STAT1 est exprimé en réponse à la TPO dans des lignées cellulaires mégacaryoblastiques et dans les plaquettes. L'activation de STAT1 entraîne son homodimérisation ou une hétérodimérisation avec STAT3 (Nagata and Todokoro, 1995) (Schulze et al., 2000). En réponse à la TPO ou aux interférons γ , STAT1 interagit avec IRF2 pour induire l'expression de TAP1 et finalement du MHC complexe I, important dans la réponse immunitaire (Rouyez et al., 2005)..

2. La voie ERK-MAPK

La famille des MAP (Mitogen Activated Proteins) kinase (MAPK) est constituée de trois niveaux de kinases : les plus en amont sont les MAPKK kinases (MAKKK ou MEKK). Elles phosphorylent les MAPK kinase (MAPKK ou MEK) qui à leur tour activent les MAP kinases (MAPK). Les MAPK comprennent les protéines ERK1/2, JNK1/2/3, p38 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$, ERK5, ERK3 et ERK7/8 qui sont chacune activée par des

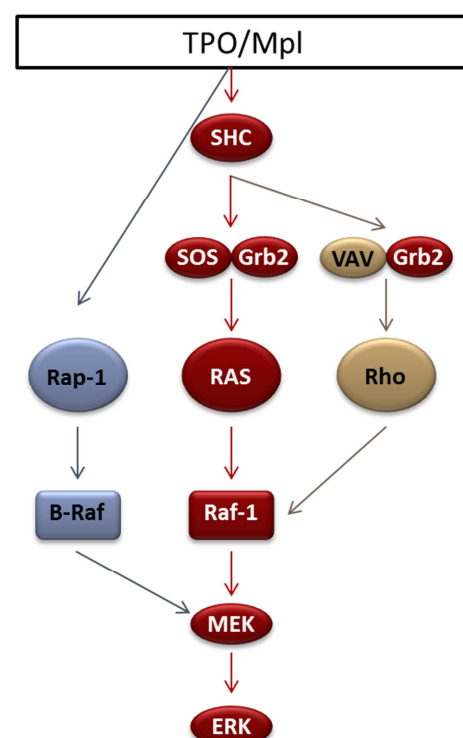
MEK et des MEKK spécifiques. Ces différents membres régulent des fonctions cellulaires diverses comme la prolifération, la différenciation, la survie ou l'apoptose (Chang and Karin, 2001).

En réponse à la TPO, le résidu tyrosine Y112 phosphorylé de Mpl va servir de plateforme pour la protéine adaptatrice SHC (Figure 12, Figure 14). SHC va à son tour être phosphorylée et recruter les protéines Grb2 activées et SOS. Ce complexe va pouvoir activer la protéine RAS. RAS appartient à la famille des petites GTPases et se trouve à la membrane plasmique. Finalement l'activation de RAS permet le recrutement de la kinase sérine et thréonine Raf-1 (MEKK) ce qui mène à l'activation de MEK-1/2 (MEK) puis de ERK-1/2 (MAPK-1/2).

Deux autres voies d'activation des protéines ERK ont été observées en réponse à la TPO. SHC et Grb2 peuvent s'associer avec Vav et activer la GTPase Rho qui à son tour va activer Raf-1 puis MEK et ERK (Miyakawa et al., 1997) (Nagata and Todokoro, 1995). Une autre voie qui participe à l'activation de ERK a été mise en évidence qui est indépendante de l'activation de Mpl sur son résidu Y112 par Jak2 mais nécessite la phosphorylation du résidu Y78. Cette voie passe par l'activation de Rap1 qui active B-Raf. Cette voie est beaucoup plus lente et se met en place à la suite de la voie Ras/Raf1. Elle permet le maintien du signal ERK (Figure 14) (Garcia et al., 2001).

Figure 14 : ERK est activée par différentes voies en réponse à la TPO

Trois voies participent à l'activation des kinases ERK en réponse à la TPO. La voie classique est la voie Ras/Raf/MEK/ERK mais deux autres voies ont été observées, notamment la voie Rap/B-Raf/ERK qui prolonge le maintien de l'activation de ERK en réponse à la TPO.



Dans les mégacaryocytes, les MAPK ERK-1/2, une fois activées, phosphorylent leur substrats (Figure 12) :

- les facteurs de transcription comme Elk1, Runx1, Myc et Jun qui permettent l'expression des gènes du cycle cellulaire *cyclin D1*, *c-myc*, *p21*, *c-fos* (Séverin et al., 2010) ;
- la Stathmin est importante dans le remodelage du cytosquelette nécessaire à l'endomitose des mégacaryocytes (Lovrić et al., 1998) ;
- le gène précoce *lex-1* est nécessaire au maintien du signal ERK (Hamelin et al., 2006).

La durée d'activation de ERK a un rôle important sur l'impact biologique final du signal. En effet, dans les cellules hématopoïétiques, la voie ERK régule la prolifération et la différenciation. Il a été observé que l'activation transitoire de ERK par des cytokines telles que l'EPO et l'IL3 induit la mise en cycle des cellules de la lignée UT7 en permettant le passage de la phase G1 à la phase S (Arai et al., 2002). A l'inverse, une activation prolongée des MAPK comme celle observée en présence de TPO, mène à la différenciation des cellules de la lignée mégacaryoblastique, UT7-Mpl (Rouyez et al., 1997). Confirmant ces résultats, l'expression de mutants permettant l'activation de façon constitutive de MEK-1/2 et donc de ERK-1/2 est suffisante pour induire la différenciation des lignées mégacaryoblastiques CMK et K562 (Melemed et al., 1997) (Racke et al., 1997). L'inhibition des MEK par les composés PD98059 ou U0126 donne des résultats différents selon la dose, le type de cellules utilisé ou encore leur état de différenciation (Rojnuckarin et al., 1999) (Fichelson et al., 1999) (Guerriero et al., 2006). L'inhibition de ERK par le PD98059 dans les progéniteurs CD34⁺ humains augmente la prolifération des cellules et la ploïdie des mégacaryocytes (Fichelson et al., 1999) ; l'ajout répété de faibles concentrations de l'inhibiteur PD98059 dans ces cellules induit la différenciation de larges mégacaryocytes hautement polyploïdes (Guerriero et al., 2006). Dans les mégacaryocytes murins, l'inhibition des MAPK diminue leur prolifération et leur ploïdie (Rojnuckarin et al., 1999). Une forte dose de l'inhibiteur de ERK entraîne la mort des cellules montrant ainsi le rôle de ERK dans la survie (Guerriero et al., 2006). Ainsi, la

voie ERK est nécessaire pour la transition entre les phases de prolifération et de maturation des progéniteurs mégacaryocytaires ainsi que pour leur survie (Fichelson et al., 1999).

Le rôle de ERK dans le compartiment des CSH a été peu analysé. Cependant, Chung et al. ont montré que l'activation constitutive de la protéine MEK dans les CSH entraîne un syndrome de type myeloprolifératif ou myéodysplasique chez la souris (Chung et al., 2011). Saulnier et al. ont observé que la perte de l'isoforme ERK1 n'entraîne pas de défauts de quiescence ou de reconstitution des CSH mais induit un défaut de différenciation de la lignée myélomonocytaire-ostéoclastique. La perte de ERK1 affecte donc le microenvironnement de la CSH (Saulnier et al., 2012). L'absence de défaut de reconstitution de ces souris a été confirmée par une étude très récente qui montre que la perte de l'un ou l'autre des isoforme de ERK n'affecte pas la fonction des CSH. Cependant, la délétion de ERK1 et ERK2 entraîne une diminution des CSH due à une diminution de la survie et de la prolifération (Chan et al., 2013).

3. La voie PI3K-AKT

Mpl ne recrute pas directement la PI3K comme c'est le cas pour R-EPO ou KIT. Il a cependant été montré que la TPO induit la phosphorylation de SHP2 et Gab2/IRS2 et promeut leur association avec la sous unité régulatrice de PI3K, p85. p110, la sous-unité catalytique de PI3K va être activée ce qui va permettre son association avec Ras. PI3K va permettre la formation de PIP3 (Phosphatidylinositol (3,4,5)-trisPhosphate). PIP3, une fois actif, va être un site de recrutement à la membrane de protéines comme Akt et la kinase PDK-1. PDK1 va alors activer Akt qui va phosphoryler de nombreuses protéines cibles impliquées dans la survie ainsi que le cycle cellulaire (Geddis et al., 2001) (Bouscary et al., 2001) (Miyakawa et al., 2001). Bad, les facteurs Forkhead, GSK-3b et la Cycline D1 vont être inhibés ce qui va respectivement empêcher l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl2,

l'expression des gènes comme *p27* et *Fas* ou la progression du cycle cellulaire (Geddis et al., 2002).

Dans les mégacaryocytes et les lignées cellulaires exprimant constitutivement Mpl, une inhibition d'Akt induit un arrêt du cycle cellulaire et de la survie observés normalement en présence de TPO. Une activation constitutive d'Akt est suffisante pour restaurer ce phénotype (Geddis et al., 2002).

F. Inhibiteurs des voies de signalisation

L'inhibition de ces différentes voies de signalisation en réponse à la TPO est aussi importante que leur activation. Elle va permettre de contrôler l'amplitude et la durée du signal et ainsi modifier les réponses cellulaires comme c'est le cas pour la voie ERK dans la différenciation des mégacaryocytes. Au moins trois mécanismes éteignent la signalisation induite par la TPO : l'expression des protéines SOCS (Supressors Of Cytokine Signaling) induites par les STAT, l'activation des phosphatases et différentes protéines adaptatrices impliquées dans l'inhibition des voies de signalisation (Kaushansky, 2009). Ces inhibiteurs agissent aussi bien sur le récepteur, que sur les Jak ou les voies de signalisation en aval (Figure 15).

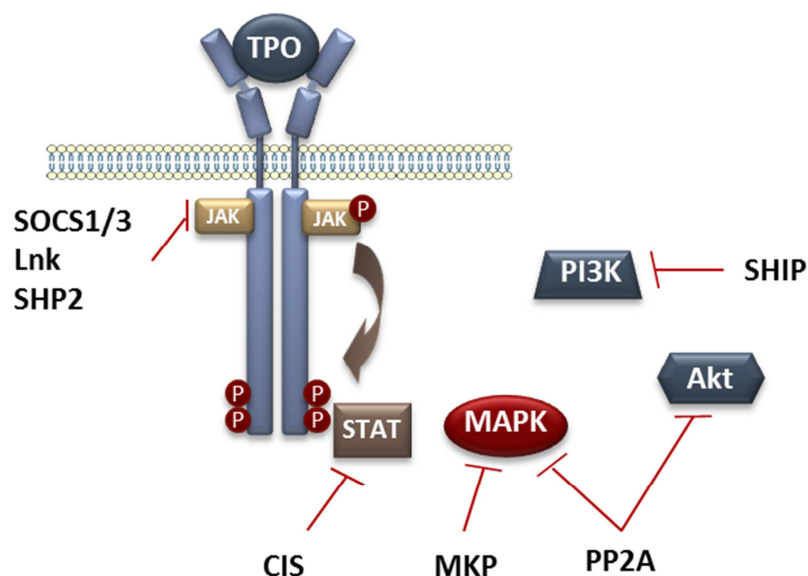


Figure 15 : Principaux inhibiteurs des voies de signalisation TPO/Mpl.

- SOCS (Supressors Of Cytokine Signaling)

La famille des SOCS comprend huit membres (CIS (Cytokine Inducible SH2 protein) ainsi que SOCS-1 à SOCS-7) qui se distinguent selon la taille de leur région N-terminale. Toutes les protéines possèdent une région spécifique des SOCS appelée la SOCS box, qui est un domaine E3-ubiquitine ligase, et un domaine SH2 capable de se fixer au niveau des phospho-tyrosines du récepteur ou des Jak. Elles peuvent soit inhiber l'activité des Jak soit entrer en compétition avec les STAT pour les sites phosphorylé du récepteur ou encore entraîner la dégradation de leurs cibles par le protéasome via leur domaine SOCS box.

Les protéines SOCS ne sont pas exprimées à l'état basal et sont induites par les voies de signalisation qu'elles inhibent et notamment après une stimulation par les cytokines et par de nombreux autres stimuli comme le LPS, les chemokines et l'insuline. Elles forment ainsi une boucle de rétrocontrôle négatif (Geddis et al., 2002). En plus de la régulation de son expression, le niveau des SOCS est finement contrôlé par des modifications de sa stabilité via l'interaction de la SOCS box avec le système ubiquitine-protéasome (Cooney, 2002).

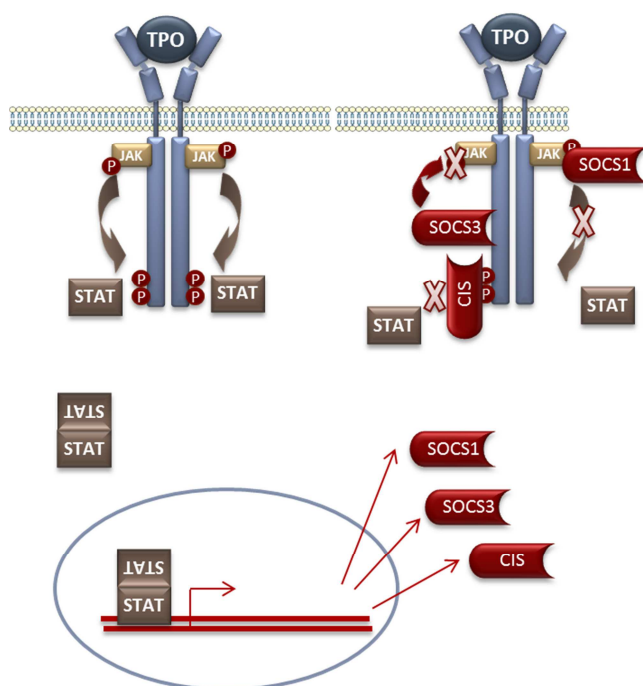


Figure 16 : Rôle des SOCS dans l'inhibition de la signalisation TPO.

En réponse à la TPO, les STAT sont activées et vont permettre l'expression de leurs gènes cibles. Parmi eux, les protéines inhibitrices SOCS1, SOCS3 et CIS qui vont respectivement agir sur l'activité ou l'activation de Jak2 ou entrer en compétition avec les protéines STAT au niveau du site phosphorylé Y112 de Mpl. Ce système permet une boucle de rétrocontrôle négatif des voies de signalisation en réponse à la TPO.

En réponse à la TPO, trois protéines SOCS sont exprimées, CIS qui va entrer en compétition avec les STAT au niveau de la tyrosine Y112 de Mpl, SOCS3 qui se fixe sur Mpl pour inhiber Jak2 et SOCS1 qui se fixe directement sur Jak2 pour l'inhiber (Figure 16) (Krebs and Hilton, 2001).

- Les protéines phosphatases

Ce groupe contient différents types de phosphatases notamment SHP1/2 (Src-homology 2(SH2) phosphatase 1 ou 2), SHIP (SH2 Inositol Phosphatase) et les protéines phosphatases de sérine et thréonine.

La famille de SHP (Src-homology 2(SH2) phosphatase) comprend SHP1 et SHP2. Ces deux phosphatases possèdent de nombreuses similarités dans leur domaine catalytique, elles ont un domaine SH2 en tandem qui permet son interaction avec les résidus phosphorylés du récepteur ou des Jak. La fixation du domaine SH2 entraîne l'activation de leur domaine catalytique phosphatase et la déphosphorylation de leurs substrats ou du récepteur. SHP1 est exprimé dans les cellules hématopoïétiques uniquement tandis que SHP2 est ubiquitaire (Neel et al., 2003).

L'utilisation de souris SHP1^{-/-} a mis en évidence une augmentation de la prolifération des cellules de moelle osseuse ainsi qu'une sensibilité accrue aux facteurs de croissance en l'absence de la phosphatase. Inversement, la surexpression de SHP1 induit la différenciation des cellules de la lignée myéloïde 32D. Des études de co-immunoprecipitation ont mis en évidence une interaction de Jak2, R-EPO, l'IL3-R ou KIT lorsqu'ils sont phosphorylés avec SHP1 (Geddis et al., 2002). L'interaction entre SHP1 et Mpl n'a pas été observé ; SHP1 pourrait donc agir sur la signalisation TPO de manière indirecte en inhibant Jak2.

Le rôle de SHP2 n'est pas encore bien défini. Il apparaît comme un régulateur négatif de la voie Jak/STAT en dephosphorylant les protéines STAT. En effet, la surexpression de SHP2 dans des cellules BA/F3 induit une diminution du niveau de STAT5 normalement phosphorylé en réponse à une stimulation par l'IL3 (Xu and Qu, 2008). A l'inverse, SHP2 est également phosphorylé en réponse à la TPO et sert de molécule adaptatrice pour les voies PI3K et MAPK. SHP2 forme un complexe avec

Mpl lorsque celui-ci est phosphorylé au niveau de la tyrosine Y112, dans les UT7-Mpl et dans les mégacaryocytes humains (Bouscary et al., 2001) (Miyakawa et al., 2001). Ainsi, il apparaît que SHP2 peut être à la fois un activateur et un inhibiteur des voies de signalisation en réponse à des facteurs de croissance. Cependant l'effet inhibiteur de SHP2 en réponse à la TPO n'a pas été observé.

SHIP est une inositol phosphatase qui agit comme régulateur négatif de la voie PI3K. Dans les lignées cellulaires hématopoïétiques, Akt est co-immunoprecipité avec SHIP en réponse à une stimulation par la TPO et cette interaction nécessite la phosphorylation de la tyrosine Y112 (Drachman and Kaushansky, 1997).

D'autres phosphatases ont été mises en évidence. Notamment, les protéines phosphatases de sérine et thréonine PP2A contenant les sous unités B56 permettent l'inhibition de MEK, ERK et Akt (Letourneux et al., 2006) (Rocher et al., 2007).

- **Lnk**

Cette protéine fait partie d'une famille de protéines adaptatrices contenant un domaine SH2, ce qui va lui permettre de se fixer sur des résidus tyrosines phosphorylés. Lnk est exprimée principalement dans les CSH, les progéniteurs et les lymphocytes. Il a été observé dans la régulation des voies de signalisation des récepteurs à cytokines tel que Mpl, KIT et R-EPO ainsi que de certains immuno-récepteurs.

Des études ont montré un rôle de Lnk dans la différenciation des mégacaryocytes et dans l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH (Tong and Lodish, 2004). La surexpression de Lnk empêche la prolifération et l'endomitose des mégacaryocytes primaires en réponse à la TPO. Les souris Lnk^{-/-} ont une augmentation du nombre de mégacaryocytes ainsi qu'une ploïdie importante dans la moelle et la rate comparé à des souris sauvages. Ainsi, en absence de Lnk, la TPO induit une forte induction des voies de signalisation STAT3, STAT5, Akt et MAPK dans les mégacaryocytes. De plus, les souris Lnk^{-/-} présentent un nombre accru de progéniteurs primitifs LSK,

couplé à une augmentation de l'auto-renouvellement des CSH. Des expériences de reconstitution en compétition de LSK Lnk^{-/-} ou sauvages montrent que les cellules déficientes pour Lnk greffent mieux en présence de TPO mais pas de SCF. Ces données montrent la spécificité de Lnk pour la signalisation en aval de la TPO et notamment sur les voies p38 MAPK, Akt et STAT5 (Seita et al., 2007). En réponse à la TPO, ces souris ont une forte activation de Jak2 maintenue dans le temps. De plus, les auteurs de cette étude montrent que dans les CSH, Lnk se fixe directement à Jak2 pour l'inhiber (Bersenev et al., 2008).

- **Lyn**

Les protéines Lyn et Fyn appartiennent à la famille des tyrosine-kinases Src (SFK). L'équipe de Drachman a montré que ces deux kinases sont actives en réponse à la TPO et notamment par la phosphorylation du résidu Y112 de Mpl dans les mégacaryocytes murins. De plus l'utilisation d'un inhibiteur des kinases Src induit une sur-prolifération des cellules BA/F3 en réponse à la TPO, une différenciation des mégacaryocytes et une augmentation de leur ploïdie dans les cellules de moelle osseuse (Lannutti et al., 2005) (Lannutti and Drachman, 2004). En utilisant des souris déficientes pour Lyn, cette équipe a montré une augmentation des voies ERK et Akt dans des mégacaryocytes en réponse à la TPO (Lannutti et al., 2006).

G. Régulation de l'expression membranaire de Mpl

La régulation de la TPO par les plaquettes et les progéniteurs myéloïdes s'accompagne d'une internalisation du récepteur par endocytose et de la dégradation de la TPO. L'internalisation de Mpl est suivie soit de sa dégradation par le protéasome ou le lysosome, soit de son recyclage à la membrane plasmique (Figure 17) (Pozner and Schattner, 2008). Il a été observé que le recyclage de Mpl n'a pas lieu dans les plaquettes mais uniquement dans les progéniteurs myéloïdes.

L'endocytose de Mpl se fait par la fixation de la protéine adaptatrice AP2 au niveau d'un motif di-leucine présent dans la Box 2. AP2 recrute ensuite les protéines structurales Clathrines qui vont permettre la formation des vésicules. Une inhibition des Clathrines par une molécule chimique ou par un sh-RNA induit un défaut d'internalisation du récepteur et de son ligand (Dahlen et al., 2003).

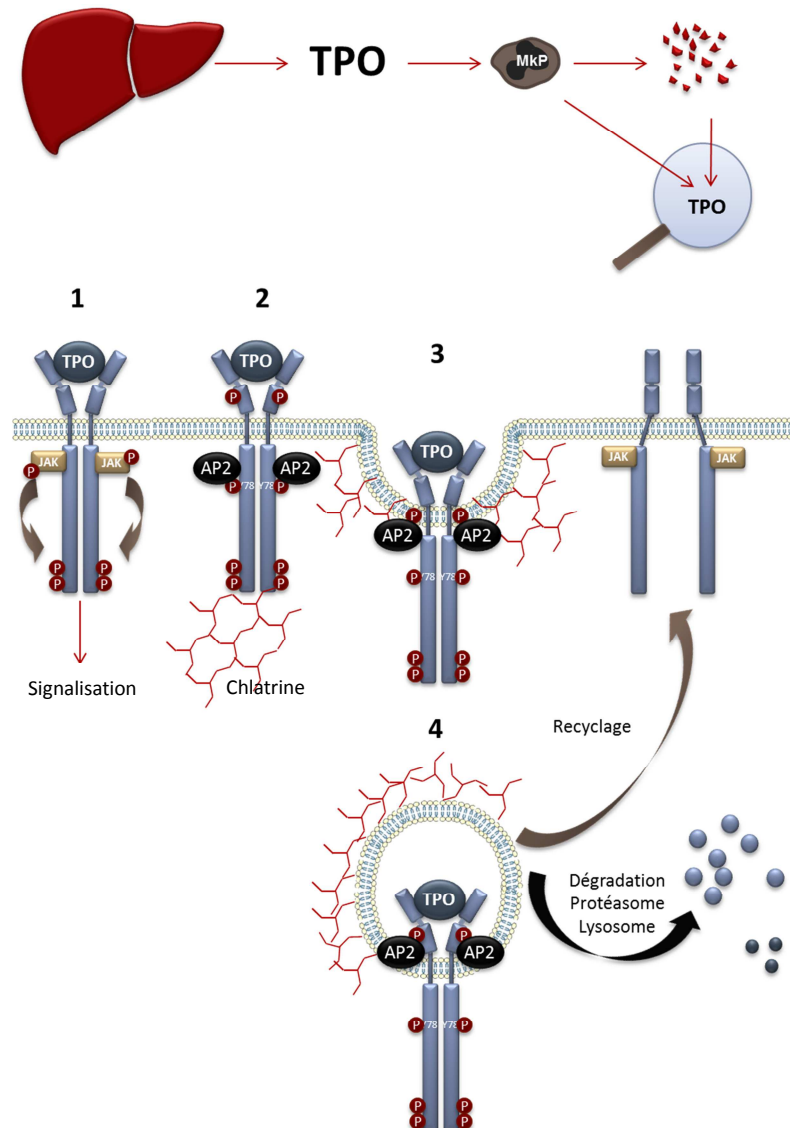


Figure 17 : Modèle de régulation de Mpl

- (1) Lors de son activation, Mpl est phosphorylé au niveau de différentes tyrosines. (2) La protéine AP2 se fixe au niveau de la Box2 et recrute les clathrines qui (3) vont permettre la formation de vésicules d'internalisation du récepteur et son ligand. (4) Le récepteur peut être soit recyclé c'est-à-dire qu'il passe par des étapes de maturation avant de retourner à la membrane sous forme inactive, soit être dégradé par la voie du lysosome ou du protéasome. La TPO est dégradée suite à l'internalisation du récepteur, ce qui régule sa quantité dans la circulation.

Peu de choses sont connues sur la dégradation de Mpl. Via le protéasome, elle fait intervenir, l'E3 ligase, c-Cbl, déjà connue pour ajouter des molécules d'ubiquitine aux récepteurs à l'EGF, au PDGF et au SCF. c-Cbl se fixe au niveau de la tyrosine phosphorylée Y78 de Mpl via l'adaptateur SHP2 (Saur et al., 2010). Une autre étude a montré une dégradation de Mpl par le lysosome. Dans ce contexte, la phosphorylation de Y8 de Mpl est un motif de dégradation lysosomale. Une mutation de ce site entraîne une augmentation du recyclage de Mpl (Hitchcock et al., 2008).

Plusieurs études ont montré un rôle des protéines Jak dans la maturation et la localisation des récepteurs de cytokines à la membrane. Tyk2 est important dans la stabilisation du récepteur aux interférons en empêchant leur dégradation par les lysosomes (Ragimbeau et al., 2003). Jak2 augmente la maturation de R-EPO dans le réticulum endoplasmique puis dans l'appareil de golgi (Huang et al., 2001). Royer et al. ont étudié le rôle de Jak2 et Tyk2 dans la maturation du récepteur (Royer et al., 2005). Ces deux protéines augmentent la localisation de Mpl à la membrane en stimulant son recyclage et en empêchant la dégradation de la forme mature glycosylée par le protéasome. Ils montrent également l'importance de la fixation du domaine FERM des Jak avec la Box1 et la Box2 de Mpl dans ce processus (Royer et al., 2005).

H. Dysfonctionnement TPO/Mpl

Comme discuté précédemment, la signalisation TPO/Mpl joue un rôle important dans la mégacaryopoïèse et l'autorenouvellement des CSH. Un dysfonctionnement des voies de signalisation induites par TPO/Mpl entraîne soit un déficit de signalisation comme observé dans la thrombocytopénie amégacaryocytaire congénitale (CAMT), une activation constitutive de ces voies comme c'est le cas dans les néoplasmes myeloprolifératifs (NMP) ou les thrombocytopénies héréditaires (TH). Différentes mutations de Mpl ont été observées conduisant à l'une ou l'autre de ces pathologies (Figure 18).

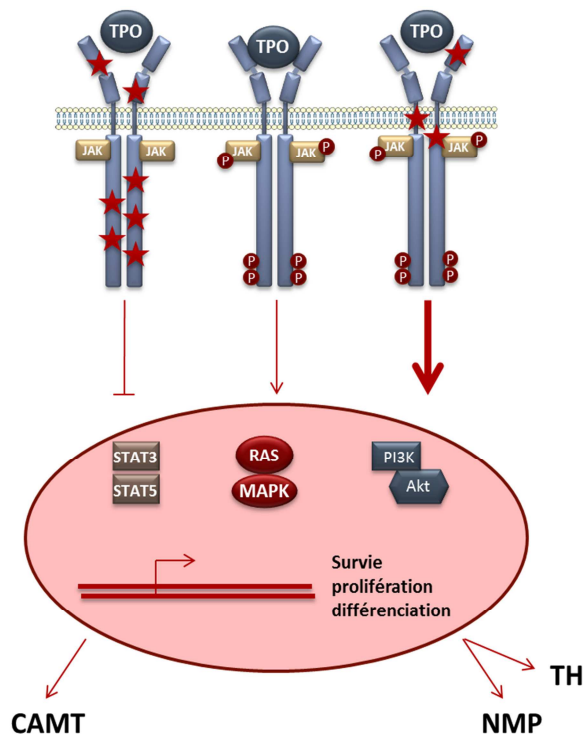


Figure 18 : Un dysfonctionnement de la voie TPO/Mpl est à l'origine de la thrombocytopénie amegacaryocytaire congénitale (CAMT), des néoplasmes myéloprolifératifs (NMP) ou des thrombocytopénies héréditaires (TH).

De nombreuses mutations ont été trouvées sur le récepteur Mpl. Selon les acides aminés touchés, elles conduisent à trois types de pathologies dues à une absence de signalisation ou inversement à une activation constitutive des voies.

1. Néoplasme Myéloprolifératif (NMP)

Les néoplasmes myéloprolifératifs sont des maladies clonales de la CSH qui présentent une hyperplasie d'un ou plusieurs lignages myéloïdes associée à une hématopoïèse clonale et qui provoque un excès de cellules dans le sang sans blocage de différenciation. Les NMP regroupent quatre types de maladies : Les leucémies myéloïdes chroniques (LMC), les Polycythemia Vera (PV), les thrombocytopénies essentielles (TE) et les myélofibroses primaires (MFP). Les LMC sont en grande majorité dues à une translocation Bcr-Abl. Les trois autres maladies sont regroupées dans les NMP non Bcr-Abl ; elles sont cliniquement proches et sont dues à une amplification anormale des érythrocytes pour PV, des plaquettes pour TE, et des lignages granuleux et mégacaryocytaires pour MFP associée pour cette dernière à une fibrose médullaire et une hématopoïèse extra-médullaire.

Il a été observé une indépendance ou une hypersensibilité des cellules atteintes aux facteurs de croissance et une activation spontanée des voies de signalisation. Une dérégulation à tous les niveaux des voies de signalisation est capable d'induire ce type de maladie. Ainsi, une activation constitutive du récepteur, une mutation activatrice des kinases Jak associées aux récepteurs ou une absence de

rétrocontrôle négatif par Lnk ou c-Cbl sont présentes dans ces maladies. 95 % des PV ainsi que 50% des TE et MFP présentent une activation constitutive de Jak2, 1 % des TE et 5 à 6% des MFP arborent une mutation constitutive de Mpl.

Dans le cas de Jak2, deux mutations majoritaires ont été trouvées, la mutation Jak2^{V617F} ou la mutation Jak2 exon 12 (Jak2^{K539L}). Ces deux mutations se trouvent dans le domaine JH2 de la protéine. Ce domaine a un rôle important dans la régulation du domaine kinase (JH1) de Jak2. Ainsi, la mutation de ce domaine entraîne une activation constitutive de Jak2 et des voies de signalisation en aval (Vainchenker and Constantinescu, 2012).

Différentes mutations de Mpl ont été observées dans ces pathologies (Figure 19). Elles touchent en très grande majorité le tryptophane 515 (W515), localisé dans le motif amphipatique KWQFP, sous le domaine transmembranaire, et qui empêche la dimérisation spontanée du récepteur (Staerk et al., 2006). Différentes mutations de W515 ont été observées : la substitution la plus fréquente est une leucine mais peut être une lysine, une alanine ou une arginine (Pikman et al., 2006). Ces diverses mutations induisent un phénotype identique : l'activation spontanée du récepteur. Des études *in vitro*, dans des lignées cellulaires, ont mis en évidence une activation constitutive des voies de signalisation Jak/STAT, PI3K et Ras/MAPK ainsi qu'une augmentation de la prolifération des cellules quand elles expriment Mpl^{W515L} comparé aux cellules qui expriment le récepteur sauvage. De plus, il a été observé une augmentation de la formation de colonies mégacaryocytaires en absence de TPO (Chaligné et al., 2008). Des expériences *in vivo* ont confirmé la relation entre la mutation Mpl^{W515L} et les ET et MFP. En effet, la xénogreffe de cellules BA/F3 transfectées avec Mpl^{W515L} dans des souris nude ou de cellules de moelle osseuse infectées par un virus exprimant Mpl^{W515L} induit une hyperplasie des mégacaryocytes, une splénomégalie et une thrombocytose (Chaligné et al., 2008) (Pecquet et al., 2010).

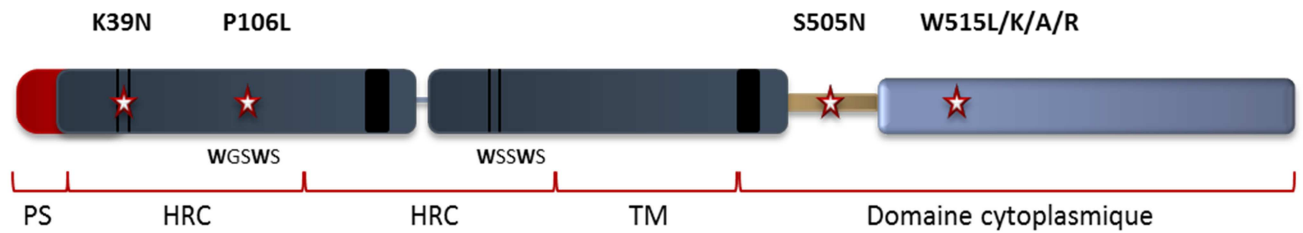


Figure 19 : Schématisation des mutations de Mpl trouvées dans les NMP et les TH

La mutation du résidu W515 est la principale mutation chez des patients atteints de NMP. Les mutations observées sur le domaine extracellulaire de Mpl conduisent à une TH. Les mutations des domaines transmembranaire et cytoplasmique induisent une dimérisation et une activation spontanée du récepteur et donnent des NMP.

2. Thrombocytopénie héréditaires (TH)

Les mutations activatrices héréditaires de Mpl induisent une thrombocytopénie héréditaire (Figure 19). Elles sont Mpl^{S505N}, Mpl^{K39N} (appelé aussi Mpl Baltimore) et Mpl^{P106L}. Mpl^{S505N} touche le récepteur dans son domaine transmembranaire et agit comme un dominant positif suffisant pour induire la dimérisation du récepteur via l'interaction forte des deux arginines créées (Ding et al., 2009). Les mutations Mpl^{K39N} et Mpl^{P106L} affectent le domaine de liaison du récepteur avec la TPO. Il a été proposé que ces mutations empêchent l'internalisation et la dégradation de la TPO sans affecter la signalisation. Ces deux polymorphismes de Mpl sont retrouvés dans des populations spécifiques, ainsi Mpl^{K39N} est restreint aux individus afro-américains et Mpl^{P106L} aux individus sub-sahariens (He et al., 2013).

3. CAMT

La Thrombocytopénie AMégacaryocytaire Congénitale (CAMT) est une maladie autosomale récessive rare observée chez l'enfant. Elle touche 0,12 à 0,24% des enfants naissants. En 1997, Muraoka et al. montrent que cette pathologie est due à une absence de réponse à la TPO (Muraoka et al., 1997). Deux ans plus tard, Ihara et al. mettent en évidence la première mutation de *c-mpl* (Ihara et al., 1999). A ce

jour, il a été observé plus de 40 mutations non fonctionnelles du récepteur chez ces patients (Figure 20).

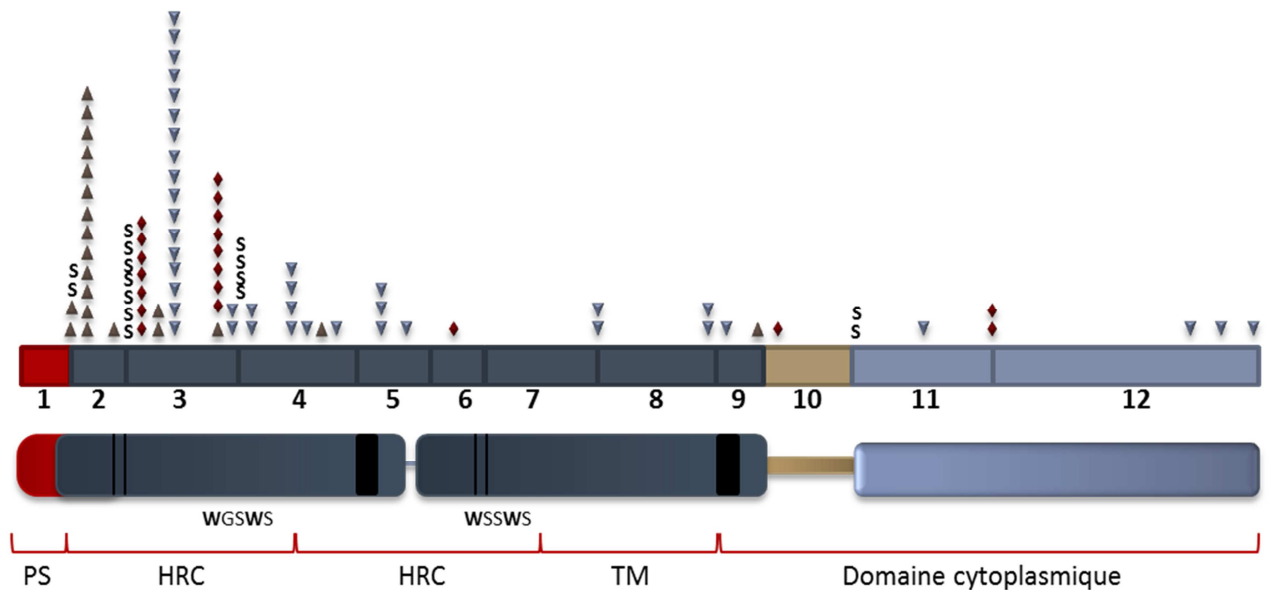


Figure 20 : Schématisation des mutations de *Mpl* trouvées dans les CAMT

Cette figure résume les différentes mutations publiées de *Mpl*, détectées chez des patients CAMT. Chaque symbole représente une mutation chez un patient, S : mutation touchant l'épissage ; ▲ : mutation non-sens ; ▼ : mutation mis-sens ; ◆ : mutation entraînant un décalage du cadre de lecture. La structure des exons ainsi que la protéine et ses domaines fonctionnels ont été représenté en dessous. (D'après Ballmaier and Germeshausen, 2009).

La CAMT se caractérise par une thrombocytopénie sévère ($< 50 \cdot 10^9$ plaquettes/L) et une absence de mégacaryocyte détectées dans les premiers mois de vie de l'enfant. Elle est suivie d'une pancytopenie plus tard dans l'enfance. Aucun défaut morphologique n'a été observé chez ces patients (Ballmaier and Germeshausen, 2009). Comme toutes les maladies entraînant une aplasie médullaire, les CAMT ont une prédisposition à développer une anémie aplasique et une tendance à développer des leucémies (Ballmaier and Germeshausen, 2009). Le seul traitement de cette maladie est à ce jour la transplantation de CSH. Cependant, la possibilité de corriger le défaut par thérapie génique est testé chez la souris (Wicke et al., 2010).

Cette maladie est classée en trois groupes selon le degré de gravité de la maladie et du nombre de plaquettes dans le sang. De façon intéressante, cette classification corrèle avec le type de mutation de *c-mpl* (Ballmaier and Germeshausen, 2009).

Le type I regroupe les patients avec un nombre de plaquettes faible ($<21 \times 10^9/L$) et une progression rapide de l'aplasie médullaire. Ce phénotype est dû à des mutations qui induisent une perte complète de la fonction de Mpl. Ces mutations peuvent être aussi bien des mutations non-sens, des délétions et des décalages du cadre de lecture ; elles induisent l'apparition d'un codon stop prématuré et donc une protéine tronquée, non fonctionnelle à qui il manque les domaines transmembranaire et intracellulaire. Des tests *in vitro* dans les lignées hématopoïétiques K562 et BA/F3, montrent que ce genre de mutation entraîne une absence de Mpl à la membrane et de ce fait aucune signalisation induite par la TPO (Tijssen et al., 2008) (Germeshausen et al., 2006).

Les patients de type II ont une thrombocytopénie plus tardive et moins sévère ($35 \times 10^9/L$ à $132 \times 10^9/L$). Le début de la pancytopenie apparaît également plus tard. Ces patients présentent un défaut partiel de la fonction de Mpl avec une activité résiduelle de la signalisation. Cet effet a été confirmé avec des expériences *in vitro* sur des lignées cellulaires (Tijssen et al., 2008) (Germeshausen et al., 2006). Les mutations observées sont majoritairement des substitutions ou des mutations touchant l'épissage alternatif. La plupart des substitutions sont situées dans la partie 3' du gène et affectent le domaine de fixation de la TPO et peu le domaine intracellulaire. Les mutations se trouvent en majorité dans les exons 2, 3 et 4, et s'étendent jusqu'à l'exon 12 (Ballmaier and Germeshausen, 2009).

Dans le groupe III, les patients ont une mégacaryopoïèse inefficace mais qui n'est pas due à une mutation du gène *c-mpl*.

III. Dommages de l'ADN et réparation

A. Induction de dommages de l'ADN

Une cellule peut subir en moyenne 10^5 altérations de son ADN par jour par son activité intrinsèque et tout autant par l'environnement. Les mécanismes de reconnaissance des dommages et de la réparation sont donc indispensables pour préserver l'information génétique (Figure 21).

On peut différencier deux types de dommages, les endogènes qui peuvent être programmés ou induits par le métabolisme de l'ADN et de la cellule, et les induits par des facteurs physiques ou chimiques environnementaux.

Les altérations de l'ADN spontanées peuvent être dues à :

- l'intégration d'une mauvaise base pendant la réplication de l'ADN
- une dépurination ou une dépyrimidation, correspondant à une perte de base et qui peuvent être spontanées en pH acide (Mol et al., 1999) ;
- une déamination qui correspond à une hydrolyse des bases qui perdent leur groupement amine. Les déamination les plus fréquentes touchent les cytosines qui sont alors remplacées par des uraciles, les adénines en hypoxanthines et les 5méthylcysthéines en thymines (Mol et al., 1999). La chaleur favorise l'hydrolyse des bases en milieu aqueux (Ehrlich et al., 1986) ;
- une erreur de méthylation entraînant une alkylation sur le carbone C6 au lieu du C5 et donc une absence de liaison hydrogène entre bases (Mol et al., 1999).

De plus, lors d'un processus de respiration normale, les mitochondries convertissent de 0.1 à 1% d'O₂ en superoxyde O₂⁻. Les superoxydes dismutases de la mitochondrie, SOD2, ou du cytoplasme, SOD1, convertissent les O₂⁻ en radicaux

libres hydroxyles (ROS, Reactive Oxygen Species) qui peuvent oxyder l'ADN et provoquer des cassures simples et doubles brins. Ainsi, 10^{22} radicaux libres sont produits par jour dans un corps humain induisant environ 10^5 lésions de l'ADN (Hoeijmakers, 2009).

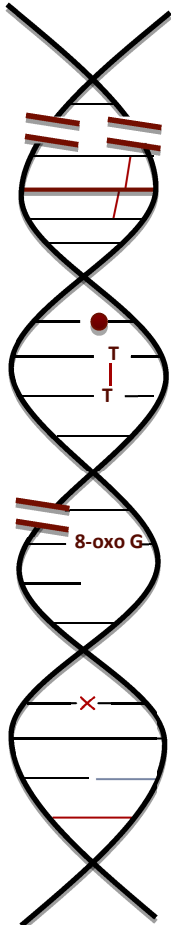
Agents de dommages de l'ADN		Type de lésion	Voies de réparation de l'ADN	Fidélité
Irradiation Rayon X Drogue chimio-thérapeutiques Blocage de la fourche de réplication		Cassures double brins Cassures simple brin Echange intra-brin Echange inter-brin	NHEJ RH	+ ++
Lumière UV Produits chimiques		Ajouts de molécules Dimers de pyrimidine	NER	+++
Radicaux libres Hydrolyse Agents alkylants		Site abasique Cassures simple brin Lésions 8-oxo Guanine	BER	+++
Erreurs de réplication		Mauvais appariement de bases Insertions Délétions	MMR	+++

Figure 21 : Les différentes voies de réparation de l'ADN

Les dommages de l'ADN peuvent être induits par de multiples causes liées au métabolisme de la cellule ou à l'environnement. Ces différents types de lésions vont induire des voies de réparation spécifiques. (D'après Blanpain et al., 2011).

La cellule peut programmer l'induction de cassures double brins qui lui sont nécessaires pendant la méiose (Keeney and Neale, 2006) ou encore pour la formation de réarrangements au niveau des gènes d'immunoglobulines lors de la V(D)J ainsi que lors de la commutation isotypique (Dudley et al., 2005).

Un autre stress endogène est un arrêt de la fourche de réplication lors de la phase S qui, lorsqu'il est prolongé, peut induire des cassures double brins (Saintigny et al., 2001). Différentes causes peuvent entraîner cet arrêt, notamment une région d'hétérochromatine, d'une oxydation de base ou encore d'une hybridation d'ARN (Hyrien, 2000).

Les agents génotoxiques induisant des cassures simples brins sont de différentes natures. Les ultraviolets forment des dimères de thymine, liaisons covalentes entre deux thymines produites par la cellule, ce qui crée des distorsions de l'hélice d'ADN. Un excès de chaleur exogène peut également induire une désamination (Sancar et al., 2004). Les agents mutagènes chimiques sont de différentes natures. Par exemple, la méthyl méthanesulfase et la témozolonide sont des agents alkylants ; la mitomycine et la cisplatine créent des liens covalents entre les brins et les inhibiteurs de topoisomérase tel que la camptothécine, induisent des cassures simple brin.

De la même façon, les cassures doubles brins peuvent être induites par des agents physiques tels que rayonnements X ou γ (IR) qui induisent une rupture du D-ribose, et par différentes drogues notamment chimiothérapeutiques. Parmi ces dernières, les inhibiteurs de topoisomérase II comme l'étoposide et la doxorubicine provoquent des cassures double brins et l'hydroxyurée induit des dommages en bloquant la fourche de réplication (Sancar et al., 2004).

Une cellule ne réparant pas efficacement son ADN entre soit en sénescence soit en apoptose ou alors continue à se diviser et peut induire des tumeurs cancéreuses. Les mécanismes de réparation sont donc indispensables et finement régulés. Ils diffèrent selon le type de lésion et selon le cycle cellulaire.

B. Reconnaissance des cassures

L'induction des mécanismes de réparation est finement régulée et le recrutement des protéines de la réparation au niveau d'une cassure double brins se présente sous la forme de foci visibles au microscope photonique. Ces structures sont dynamiques et sont régulées de façon spatio-temporelle (Bekker-Jensen et al., 2006).

La mise en place de la cascade de signalisation se fait via un ensemble de modifications post-translationnelles comprenant phosphorylations, ubiquitinations, sumoylations, acétylations et méthylations.

La réponse aux dommages de l'ADN est composée de senseurs de dommage de l'ADN (PARP, MRN, Ku70-Ku80, RPA), de transducteurs qui relaient et amplifient le signal (DNA-PKc, ATM, ATR), de médiateurs (53BP1, BRCA1, γ H2AX) et d'effecteurs (p53 et ses cibles ainsi que les protéines des voies de réparation) qui vont induire différentes réponse cellulaire : arrêt du cycle cellulaire en G1/S/G2 et la réparation, apoptose ou sénescence (Figure 22).

Les voies de réponse aux dommages de l'ADN sont régulées par deux protéines majeures : ATM (Ataxia Telangectasia Mutated) et ATR (Ataxia Telangectasia Rad3-related protein), deux membres de la famille Phospholinoside 3-Kinase related Kinases (PIKK).

Ainsi, la reconnaissance d'une cassure double brins par le complexe MRN (composé des protéines Mre11, Nbs1 et Rad50) entraîne l'activation d'ATM qui va s'auto-phosphoryler sur plusieurs sérines et notamment la sérine S1981 qui lui confère son activité kinase. Tandis qu'en cas de lésions dues à un blocage de la fourche de réplication ou de formation de simples brins débordants, les extrémités sont reconnues et stabilisées par les protéines RPA (Replication Protein A). RPA va ensuite recruter ATRIP (ATR Interacting Protein) sur l'ADN. ATRIP interagit avec ATR et l'active (Cimprich and Cortez, 2008).

L'activation d'ATM ou d'ATR conduit à la phosphorylation de H2AX (alors appelé γ H2AX) qui sert de plateforme pour les protéines de la réparation et du checkpoint (Savic et al., 2009). Grâce à la protéine MDC1 (Mediator of DNA damage Checkpoint 1), le signal γ H2AX va être ensuite diffusé et amplifié sur plusieurs méga-bases (Rogakou et al., 1999). ATM et ATR ont aussi pour substrats Chk1 (Checkpoint 1), Chk2 (Checkpoint 2) et p53 qui permettent l'arrêt du cycle cellulaire et l'apoptose, mais aussi les protéines 53BP1 (p53 Binding Protein 1) et BRCA1 (Breast Cancer 1)

respectivement importantes dans la mise en place de la NHEJ (Non homologous End Joining) et la RH (Recombinaison Homologue) (Zhou and Elledge, 2000).

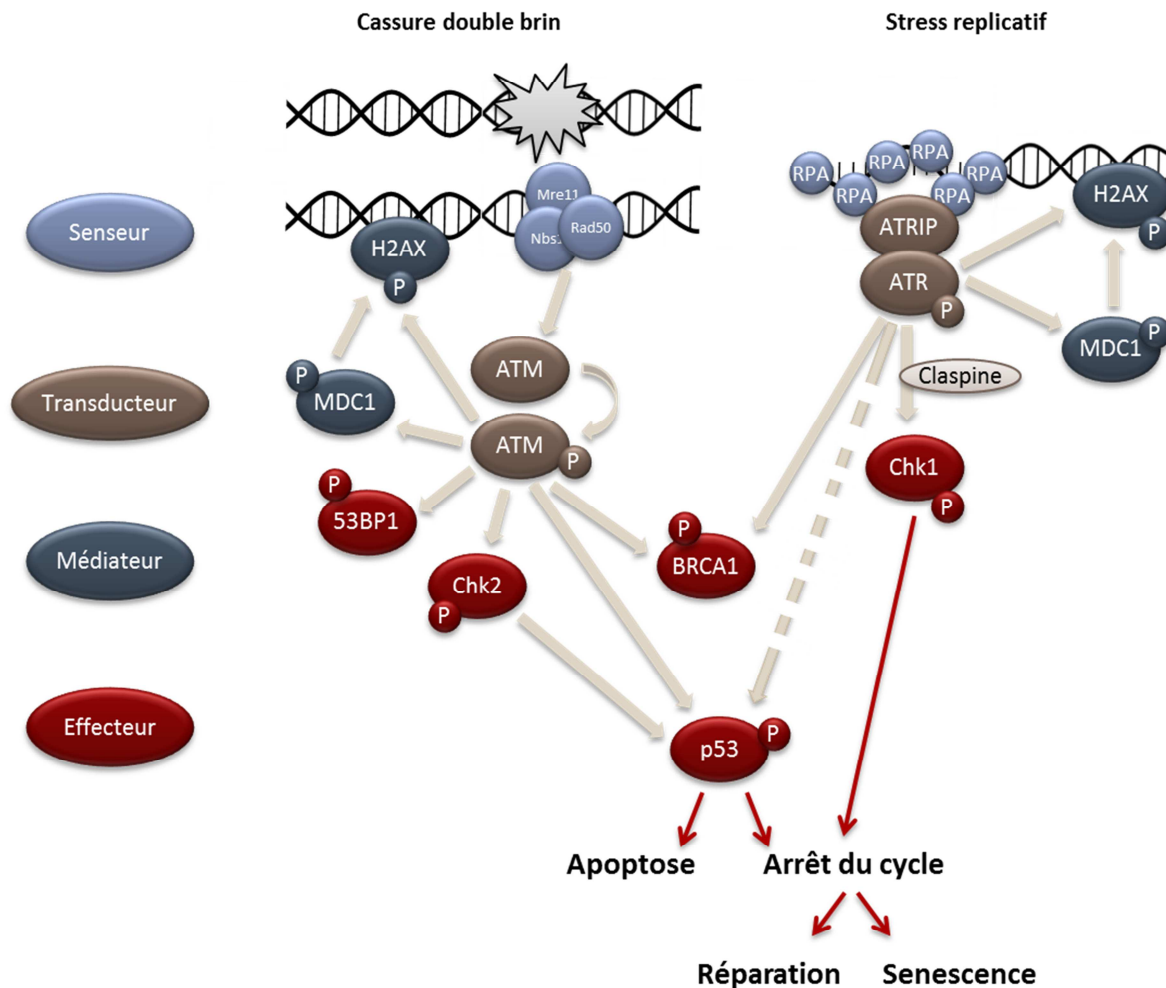


Figure 22 : La réponse aux dommages de l'ADN

En réponse à des cassures double brins, différentes voies se mettent en place pour relayer et amplifier le signal. Elles aboutissent à l'arrêt du cycle cellulaire et la réparation de l'ADN par les voies RH ou NHEJ ou alors à la mort de la cellule par apoptose.

p53 est un acteur critique de la réponse aux stress génotoxiques. La puissance et la durée d'activation de p53 ainsi que ses cibles vont permettre l'arrêt transitoire du cycle cellulaire via l'induction de *p21*, la mort de la cellule par apoptose via l'induction des gènes de la famille de *Bcl2* (*Bax*, *Puma* et *Noxa*) ou la senescence via l'induction

de *p16/Inka4* et *p19/ARF* (Riley et al., 2008). p53 permet aussi l'expression de ses régulateurs négatifs comme *Mdm2* et *Wip*. p53 va donc être activé de façon transitoire sous forme d'oscillation ce qui permet au checkpoint de vérifier le niveau de réparation (Batchelor et al., 2009).

C. Arrêt du cycle cellulaire

Le mécanisme de surveillance des dommages de l'ADN est appelé checkpoint. Il est essentiel pour déterminer le taux de dommages de la cellule. Cet événement entraîne la réparation des cassures de l'ADN et la survie de la cellule. Mais il peut également induire l'élimination de la cellule via un état latent, appelé senescence, ou par sa mort via l'apoptose. Ces différents statuts cellulaires seront détaillés par la suite.

La mise en place des checkpoints par ATM et ATR aboutit à l'arrêt transitoire du cycle cellulaire. Cette étape est indispensable pour laisser le temps aux différents mécanismes de réparer l'ADN avant des phases comme la réplication ou la mitose. Ainsi, plusieurs checkpoints sont possibles permettant l'arrêt en phase G1, pendant la phase S ou encore en phase G2 (Figure 23).

Les acteurs clés du checkpoint sont les kinases Chk1 et Chk2. Ces deux protéines possèdent un domaine kinase conservé mais différent dans leurs formes et leurs structures. Chk2 est exprimé tout au long du cycle cellulaire sous forme inactive. Il est principalement activé par phosphorylation par ATM lors d'un dommage de l'ADN. Chk1 est exprimé et actif uniquement en phase S et G2 et son activation est augmentée lors de dommages de l'ADN induits par des blocages de la fourche de réplication. La phosphorylation de Chk1 par ATR nécessite un intermédiaire, la Claspine qui permet l'interaction entre les deux protéines et qui est activée lors d'un blocage de la fourche de réplication (Bartek and Lukas, 2001).

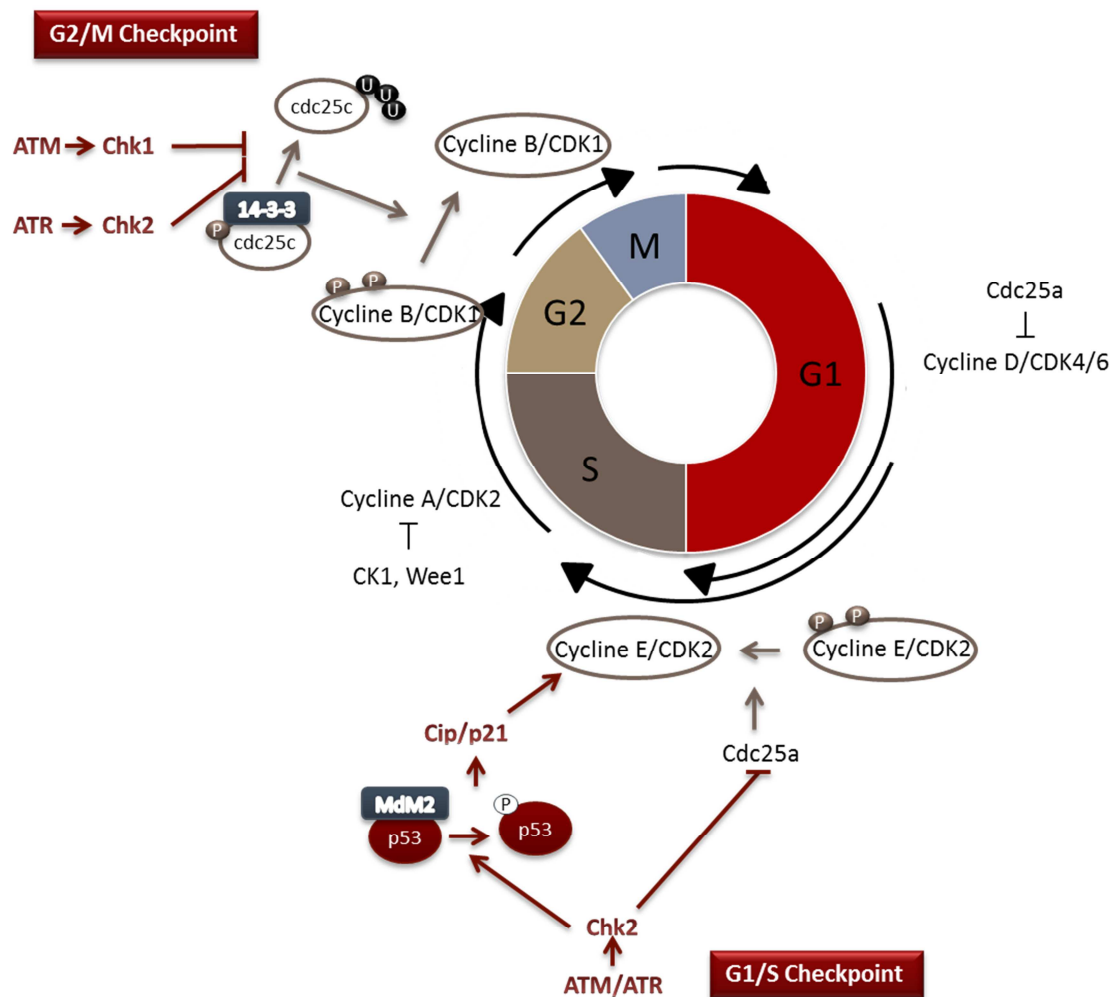


Figure 23 : Schéma de la mise en place des checkpoints

En réponse à un dommage de l'ADN, le cycle cellulaire est arrêté pour laisser le temps à la cellule de réparer ses cassures de l'ADN durant les différentes phases du cycle cellulaire. Ces arrêts peuvent être dépendants ou indépendants de l'activation de p53.

Les rôles de Chk1 et Chk2 sont semblables dans le sens où ces deux protéines sont activées en réponse aux dommages de l'ADN, ont des substrats communs et sont nécessaires à l'arrêt du cycle cellulaire (Bartek and Lukas, 2003). En effet, toutes deux permettent la phosphorylation et l'inhibition des phosphatases Cdc25 (Cell Division Cycle 25). Les trois membres de la famille des Cdc25 (Cdc25A, Cdc25B et Cdc25C) sont nécessaires à la transition des phases du cycle cellulaire en déphosphorylant les CDK (Cyclin Dependent Kinase). La phosphorylation de Cdc25A entraîne sa dégradation par le complexe SCF^{βTRCP} (Skp, Cullin, F-box) du

protéasome tandis que la phosphorylation de Cdc25B et Cdc25C entraîne leur ubiquitination et leur séquestration dans le cytoplasme.

- L'arrêt en phase G1 nécessite l'inhibition de Cdc25A qui lors de la transition en phase S déphosphoryle CDK2, ce qui permet son interaction avec la cycline E. Cette inhibition est rapide mais transitoire. Le maintien de l'arrêt du cycle cellulaire passe par la phosphorylation et donc l'activation de p53 par ATM et ATR ou par Chk1/Chk2. De plus, ATM/ATR phosphorylent et inhibent l'ubiquitine ligase Mdm2, un inhibiteur de p53. L'activation de p53 permet l'expression de ses gènes cibles et notamment de p21 (*WAF1/Cip1*), un inhibiteur de CDK2.
- L'arrêt pendant la phase S se fait par le même mécanisme indépendant de p53 que pour l'arrêt en G1.
- Enfin, l'arrêt en phase G2 est le checkpoint le plus important puisqu'il permet la vérification de l'ADN des cellules avant la mitose et donc d'éviter la propagation de dommages mal réparés. Cdc25C est inactivée par Chk1/Chk2 ce qui empêche l'activation du complexe CyclineB/CDK1. Cet arrêt du cycle cellulaire est transitoire et comme pour l'arrêt du cycle en G1, une voie p53 dépendante permet également de le maintenir. p53 permet l'expression des protéines 14-3-3 et GADD45 (Growth Arrest and DNA Damage 45) qui normalement empêche l'ubiquitination de Cdc25C et sa séquestration.

D. Apoptose et senescence

p53 est l'acteur majeur de la réponse apoptotique. En cas de dommages non réparables, p53 est fortement activé et s'accumule dans le noyau. Il va induire l'expression de ses gènes cibles pro-apoptotiques, *Bax*, *Puma*, *Noxa*, *Bid* et le récepteur *Fas* (Fas-R) ou activer directement Bax à la mitochondrie. Ces protéines vont permettre l'inhibition de la protéine anti-apoptotique Bcl2, et activer les voies apoptotiques mitochondriales et la voie Fas/Fas-L (Figure 24) (Fridman and Lowe, 2003).

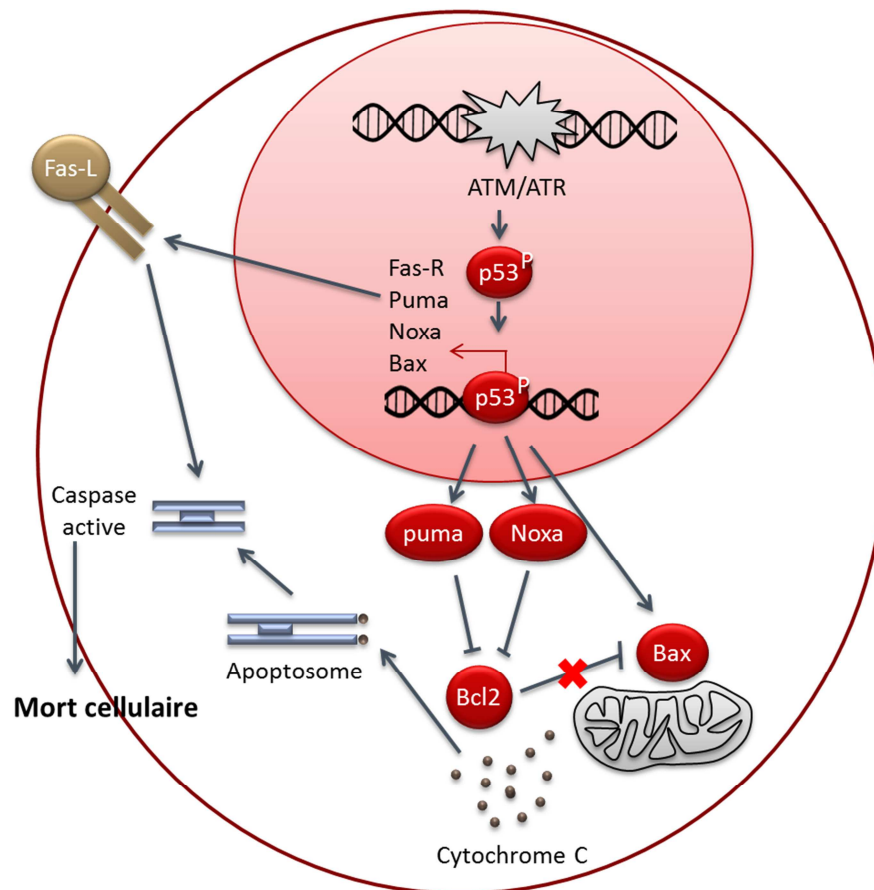


Figure 24 : Mise en place de l'apoptose en réponse à un stress génotoxique

La sénescence est l'arrêt irréversible du cycle cellulaire. La cellule reste alors métaboliquement active et résistante à l'apoptose mais est incapable de se diviser. Différents stress peuvent induire le passage de la cellule en sénescence : le vieillissement de la cellule, mesuré par le raccourcissement des télomères, les dommages de l'ADN, des stress non génotoxiques tel que des perturbations de l'organisation de la chromatine ainsi que par des signaux mitogéniques comme ceux induits par des proto-oncogènes (Collado et al., 2007) (Campisi and D'Adda di Fagagna, 2007). Dans les deux premiers cas et en réponse à certains proto-oncogènes, l'entrée de la cellule en sénescence passe par un mécanisme dépendant de p53.

L'activation de p53 permet l'expression de p21 qui comme dit précédemment va permettre l'arrêt du cycle cellulaire en G1. L'expression de la protéine p16^{Ink4} est

également nécessaire au processus de sénescence. Les signaux qui vont permettre son expression ne sont pas déterminés mais une dérégulation du cycle cellulaire est indispensable. p16^{Ink4} va inhiber la phosphorylation de Rb (Retinoblastoma) par le complexe CyclineD/CDK4 et maintenir un arrêt permanent de la prolifération (Sperka et al., 2012).

E. Voies de réparation

1. Cassures simple brin

Trois mécanismes majeurs entrent dans cette catégorie : la réparation par excision de base (BER : Base Excision Repair), par excision de nucléotides (NER : Nucleotide Excision Repair) ou la réparation des mésappariements (MMR : MisMatch Repair). Bien que les protéines de chaque voie soient différentes, elles ont toutes les trois un mécanisme commun : les protéines senseurs vont reconnaître les mutations, puis une exonucléase va couper le brin autour du défaut, une polymérase va synthétiser le brin et enfin une ligase va les ressouder (Figure 25).

La voie BER permet la réparation des lésions courtes (1 à 6 nucléotides) induites principalement par les stress oxydatifs ou alcalins. C'est un mécanisme rapide en plusieurs étapes. Le mésappariement est reconnu par des glycosylases qui vont ôter la base, générant ainsi un espace vide appelé AP (Apurine ou Apyrimidine). Ce site est ensuite reconnu par l'endonucléase APE1 (Activator Protein 1) qui va cliver le désoxyribose. La cassure créée va être reconnue par le senseur PARP (Poly-ADP-Ribose Polymerase) puis l'ADN polymérase POLb (Polymerase b) en complexe avec XRCC1 (X-ray Repair Cross-Complementing 1) va pouvoir réparer avec la base correspondante en utilisant le brin homologue. La ligase III va pouvoir ensuite ressouder les deux brins (Dianov and Parsons, 2007).

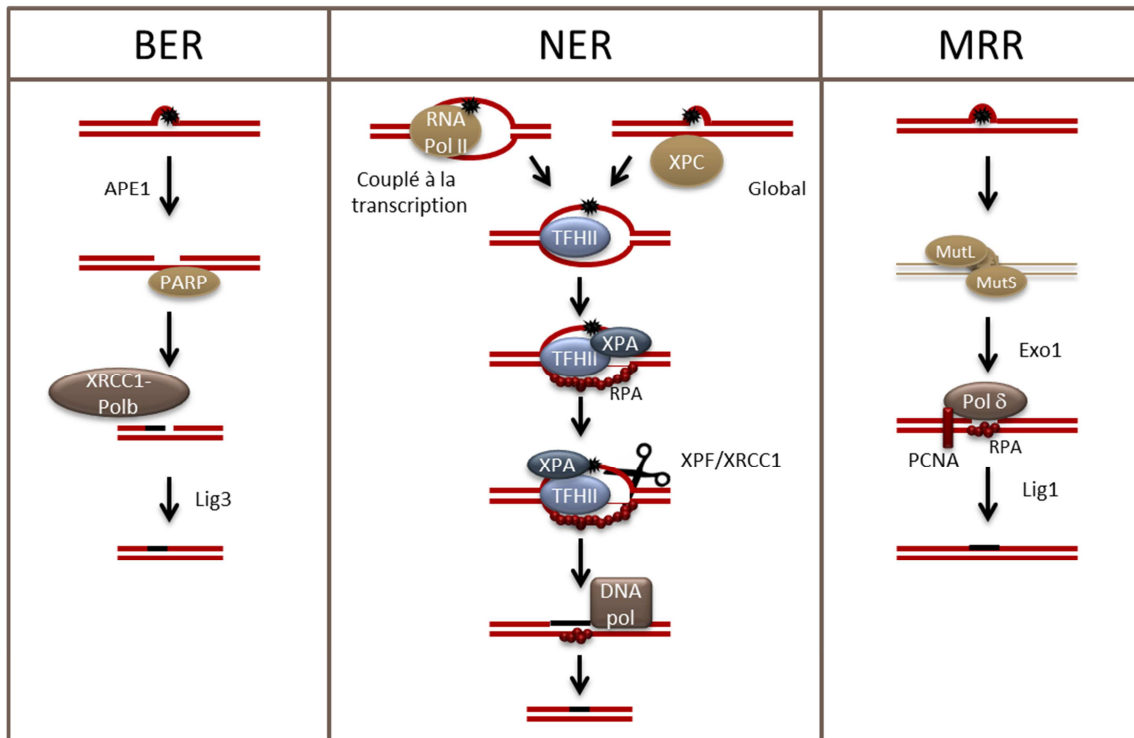


Figure 25 : Voies de réparation mises en place lors d'induction de cassure simple brin.

La voie NER est le mécanisme de réparation le plus utilisé par la cellule, il permet la réparation de lésions gênantes pour la structure de l'ADN comme les dimères de thymine ou les pontages inter- ou intra-brin. Deux types de mécanismes de reconnaissance sont utilisés dans cette voie mais le mécanisme de réparation reste le même : la GGR (Global Genome Repair) reconnaît les défauts d'ADN à travers le génome tandis que la TCR (Transcription-Coupled Repair) reconnaît les défauts induits lors de la transcription (Hoeijmakers, 2009). Le senseur XPC (*Xeroderma Pigmentosum*, complementation group C) ou un blocage de la RNA polymérase II permettent le recrutement des facteurs de la voie. Les brins d'ADN vont être ouverts par TFHII (Transcription Factor II Human), le brin sans dommage est stabilisé par RPA tandis que le brin présentant le défaut est stabilisé par XPA (*Xeroderma Pigmentosum*, complementation group A). Des endonucléases vont ensuite enlever les nucléotides abîmés et les facteurs de la réplication vont synthétiser un nouveau brin (De Laat et al., 1999).

La MMR est un mécanisme très conservé dans l'évolution et qui a notamment été très étudié chez la levure et chez *E. Coli*. C'est un mécanisme de surveillance de la réplication notamment des erreurs réalisées par la polymérase. Il permet donc d'augmenter la fidélité de la réplication. Les erreurs sont reconnues par les complexes MutS et MutL, qui vont recruter l'exonucléase Exo1. Celle-ci va créer des coupures pour dégrader une portion du brin contenant l'erreur. La polymérase δ en complexe avec PCNA (Proliferating Cell Nuclear Antigen) synthétise le brin dégradé puis la ligase I ressoude les brins (Jiricny, 2006).

2. Cassures double brins

Les cassures double brins ne sont pas les dommages les plus fréquents mais sont les plus toxiques pour la cellule car elles peuvent générer des réarrangements de séquences. De plus, en cas de lésions mal réparées, la cellule peut rester bloquée dans son cycle, ce qui peut lui être délétère.

Le mécanisme de réparation est bi-phasique, la première phase comprend les deux ou trois heures suivant les dommages de l'ADN et est une phase rapide correspondant à la réparation d'un ADN accessible c'est-à-dire à des dommages dans les régions d'euchromatine. La seconde phase est beaucoup plus lente puisqu'elle dure environ 24h à plusieurs jours après l'induction du dommage ; elle correspond à la réparation de l'ADN dans de l'hétérochromatine (Figure 26) (AA Goodarzi, P Jeggo, and M Lobrich, 2010).

Il existe deux voies majoritaires pour la réparation des cassures doubles brins de l'ADN, la voie de la recombinaison homologue (RH) ou la voie Non Homologous End Joining (NHEJ). En cas d'absence ou d'inhibition de ces deux voies, une troisième voie peut être mise en place, la NHEJ alternative.

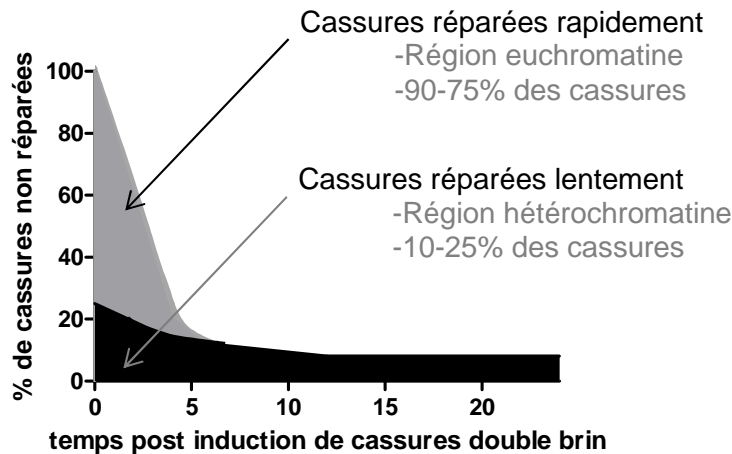


Figure 26 : La réparation de l'ADN est bi-phasique

La majorité des dommages de l'ADN sont réparés rapidement, ils se trouvent dans des zones de chromatine de faible complexité. A l'inverse, la deuxième phase correspondant à une réparation lente a lieu dans des zones d'hétérochromatine. (D'après Goodarzi et al., 2010).

a. **La voie de la recombinaison homologue (RH)**

La voie de la recombinaison homologue est majoritairement utilisée lorsque des cassures double brins sont produites par le blocage des fourches de réplication de l'ADN ou que les extrémités des télomères sont accessibles, c'est-à-dire lorsqu'il y a formation de simple brin débordants (Hackett and Greider, 2003). Cette voie de réparation est considérée comme très fidèle puisqu'elle utilise une chromatide sœur comme modèle de synthèse d'ADN, mais ne peut donc être utilisée qu'en phases S/G2 (Figure 27).

BRCA1 est un facteur clé de la recombinaison homologue, il est l'un des premiers facteurs recruté au niveau du site de cassure. Comme présenté dans un prochain paragraphe, il permet la mise en place de cette voie en inhibant les autres. La voie de la RH est initiée par le senseur MRN (complexe composé des protéines Mre11, Rad50 et Nbs1) qui d'une part, reconnaît le dommage et d'autre part va former des extrémités 3' débordantes en complexe avec la nucléase CtIP (C-Terminal

Interacting Protein) (Sartori et al., 2007). L'endonucléase Mre11 introduit des cassures sur le duplexe d'ADN jusqu'à 300 paires de bases autour du site de cassure (Garcia et al., 2011). Avec CtIP, Mre11 initie la résection puis les nucléases Exo1 et BLM continuent la résection (Nimonkar et al., 2011).

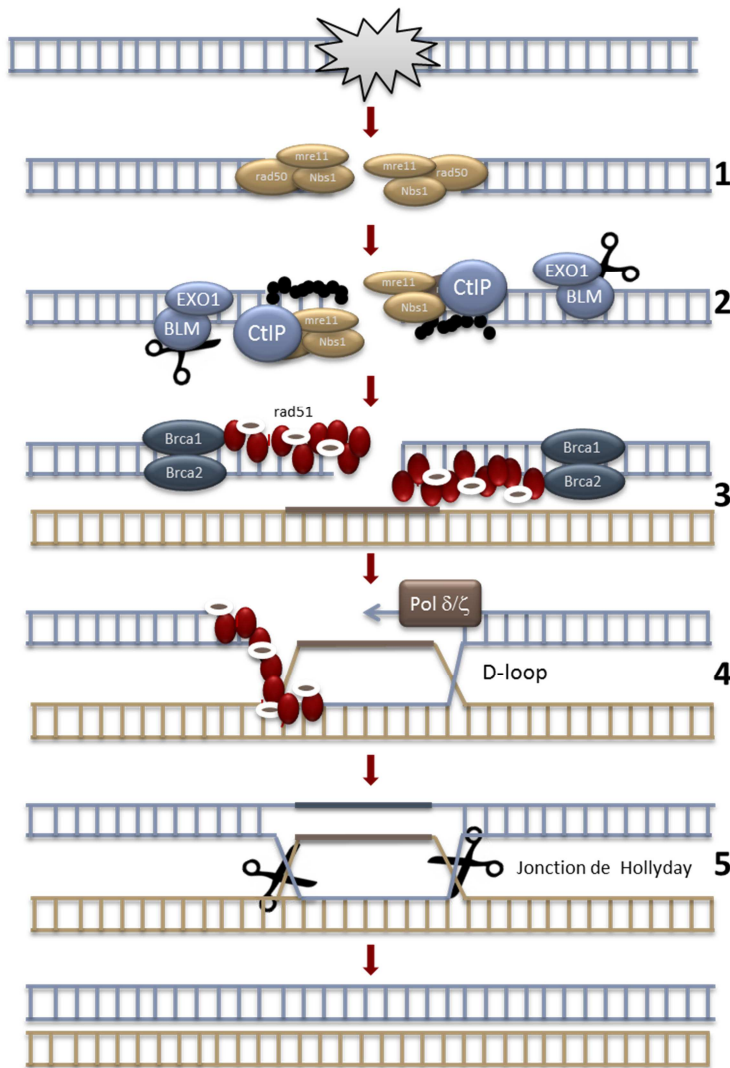


Figure 27 : La voie de la recombinaison homologue (RH)

(1) Les cassures doubles brins sont reconnues par le complexe MRN composé des protéines Mre11, Nbs1 et Rad50. (2) Celui-ci va permettre la résection des brins avec la protéine CtIP ainsi que les nucléases BLM et Exo1. (3) BRCA1 et BRCA2 vont recruter Rad 51 qui vont former des filaments autour des extrémités débordantes. (4) Celles-ci envahissent le chromosome homologue au niveau d'une séquence identique formant la D-loop. L'utilisation d'une séquence homologue sert de modèle aux polymérases δ/ζ qui génèrent une structure appelée Jonction de Holliday. (5) Son clivage par des nucléases termine le mécanisme de réparation. Cette méthode est la plus fidèle, elle nécessite cependant un chromatide homologue et ne peut donc être utilisée que pendant les phases S/G2.

Les extrémités débordantes sont stabilisées par des protéines RPA. RPA est un complexe hétérotrimérique avec une très forte affinité pour les simples brins débordants et qui permet d'éviter la formation de structures secondaires de l'ADN qui auraient un effet inhibiteur sur l'étape suivante (Sung and Klein, 2006).

La deuxième étape du processus est la formation d'une synapse de réparation. BRCA1 permet l'accumulation de PALB2 (Partner and Localizer of BRCA2) qui à son tour va recruter BRCA2 (Breast Cancer 2) (Sy et al., 2009). BRCA2-PALB2 interagit

avec les ATPases Rad51 (West, 2003). Rad51 va alors former des structures filamenteuses (NPF : NucleoProtein Filament) qui vont s'enrouler autour de l'extrémité d'ADN. Rad51 est une protéine centrale de la voie de la recombinaison homologue car elle permet l'appariement des séquences homologues et l'échange de brin. Finalement, la protéine Rad54 se fixe à Rad51 et permet la stabilisation des NPF, stimule la recherche d'homologies et le remodelage de la chromatine pendant la recherche et l'échange de brin (Heyer et al., 2006).

Les NPF vont rechercher des homologies par fixation aléatoire des filaments sur la chromatide sœur et vont ainsi tester plusieurs séquences (Bianco et al., 1998). Pour la voie de la recombinaison homologue, l'homologie doit être d'au moins 100 pb (Ira and Haber, 2002). Les extrémités 3' débordantes avec Rad51 vont aller envahir la séquence modèle formant la D-loop. Rad54 a également un rôle à ce niveau en permettant la dissociation de Rad51 avec l'ADN (Solinger et al., 2002). L'invasion du brin peut être allongée grâce aux polymérases delta et zeta jusqu'au niveau du site de coupure.

La synthèse est suivie d'une étape de réhybridation qui va former des structures appelées jonctions de Holladays (West, 2003). Le clivage de la D-Loop se fait ensuite par des endonucléases (Mus81-Eme1, BLM-TOPIIIa, Gen1 ou SXL4-SXL1) (Boddy et al., 2001) (Wu and Hickson, 2003) (Svendsen and Harper, 2010) et peut entraîner un échange de brin ou une conversion génique.

b. *La voie de la Non Homologous End Joining (NHEJ)*

(1) Mécanisme

Cette voie permet la liaison directe des brins d'ADN cassés (Roth et al., 1985) et est active tout au long du cycle cellulaire (Figure 28).

La protéine H2AX, une fois phosphorylée recrute la protéine 53BP1. Cette dernière a un effet inhibiteur sur la formation de simple brin débordant ce qui favorise l'utilisation de la voie NHEJ et préserve les extrémités des nucléases (Bunting et al., 2010).

Les protéines impliquées dans la voie NHEJ sont Ku, DNA-PKc (DNA-Dependent Protein Kinase catalytic subunit), Artemis, les polymérases μ et λ , XLF/Cernunnos (XRCC4-Like Factor), XRCC4 (X-ray Repair Cross-Complementing 4) et la DNA ligase IV (Burma et al., 2006).

Le complexe Ku se présente sous la forme d'un hétérodimère Ku70-Ku80. Il possède une grande affinité pour les extrémités libres de l'ADN et il permet le recrutement et la stabilité des enzymes de la NHEJ au niveau des extrémités, il sert donc de protéine plateforme.

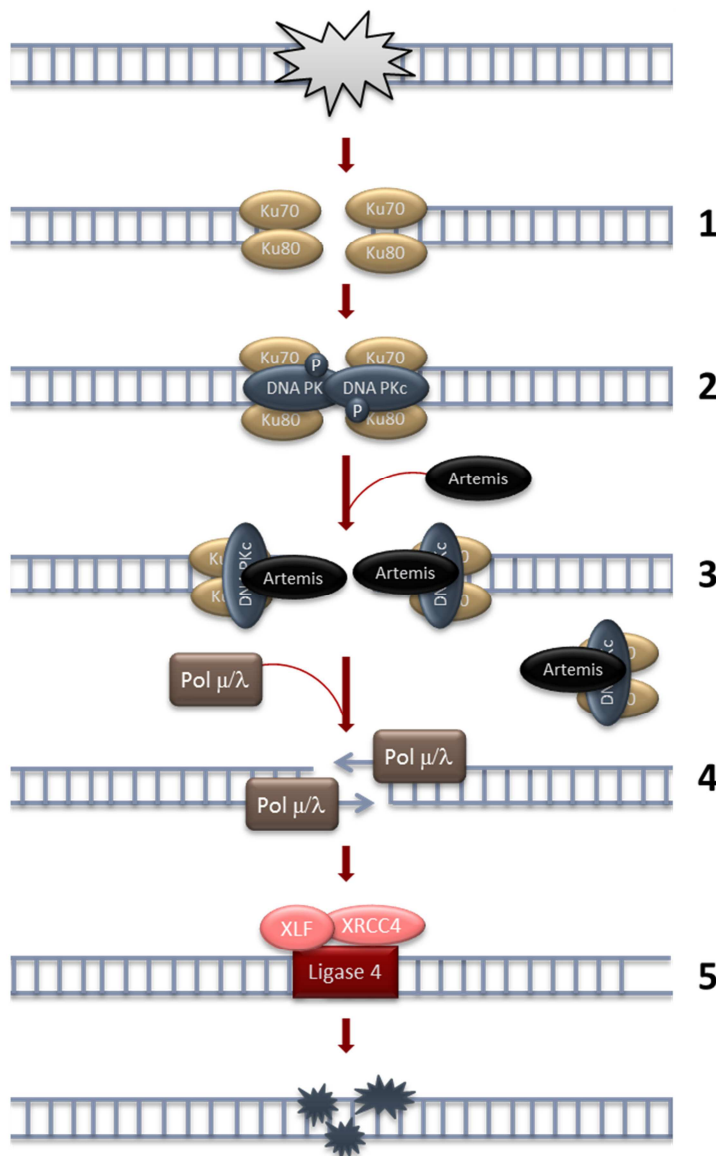


Figure 28: La voie NHEJ

Cette voie de réparation est la plus couramment utilisée en cas de cassure double brins de l'ADN. (1)

Ces dernières sont reconnues par les senseurs Ku70-Ku80 qui vont recruter la sous-unité catalytique DNA-PKc (2) pour créer le complexe DNA-PK. Celui-ci s'active et recrute la nucléase Artemis (3) qui va nettoyer l'extrémité des brins d'ADN. (4) Les polymérases μ et λ synthétisent les séquences manquantes puis (5) la ligase IV avec ses cofacteurs XLF/Cernunnos et XRCC4 lie les extrémités.

Cette voie de réparation est un mécanisme fidèle mais qui peut présenter quelques mutations au niveau du site de cassure dues à la préparation des brins par Artémis.

La fixation de Ku sur les extrémités va permettre le recrutement de la sous unité catalytique de la DNA-PK (DNA-PKc) (Gottlieb and Jackson, 1993). Avec les

protéines Ku, elle forme un complexe appelé DNA-PK. Ku va changer de conformation et laisser les brins d'ADN accessibles à DNA-PKc, qui va s'y fixer. Les DNA-PKc de chaque extrémité vont former un pont appelé synapse NHEJ (DeFazio et al., 2002). De plus la fixation de DNA-PKc sur l'ADN va permettre l'activation de son domaine kinase (Yaneva et al., 1997). La DNA-PK va ensuite s'auto-phosphoryler et se dissocier de l'ADN (Douglas et al., 2002) (Chan et al., 2002a). Les brins d'ADN vont pouvoir être accessibles aux autres protéines de la voie (Meek, 2009). La DNA-PK forme également un complexe avec la protéine Artemis et la phosphoryle. Artemis a un rôle d'exonucléase 5'-3' mais en complexe avec la DNA-PK, elle acquiert un rôle d'endonucléase et une capacité à ouvrir les conformations « épingles à cheveux » de l'ADN. L'activité d'endonucléase permet de modifier le site de dommage pour rendre les extrémités d'ADN liables (Ma et al., 2005).

DNA-PK recrute ensuite les polymérases mu et lambda qui vont synthétiser l'ADN manquant entre les deux brins. Bien que sujet à débat, il semblerait que la polymérase mu est en plus capable d'accomplir cette synthèse sans séquence modèle (Yamtich and Sweasy, 2010).

Le processus se termine avec l'action de la ligase IV. Ku interagit avec XRCC4 qui fixe et stabilise la ligase (Grawunder et al., 1997). Puis, la protéine XLF stimule la capacité de la ligase IV à souder différentes formes d'extrémités (Tsai et al., 2007) (Gu et al., 2007). Grâce à XLF/Cernunnos, elle est la seule enzyme à pouvoir liguer des extrémités incompatibles sans aucunes homologies (Gu et al., 2007).

En présence de la DNA-PK, les extrémités de l'ADN sont rapidement capturées et la chromatine change de structure pour faciliter la synapse de réparation. La vélocité du processus et le changement de conformation local permet de faciliter la réparation avec les brins corrects et d'éviter la formation d'aberrations chromosomiques. Il est cependant courant d'observer de petites délétions, insertions ou substitutions autour du site de cassure (Lieber, 2010). Ceci est dû au fait que les extrémités générées par les radiations ionisantes présentent souvent des dommages sur les bases et sur les sucres et qui peuvent empêcher l'action de la ligase. Pour que ces extrémités soient accessibles aux ligases, des nucléases génèrent des altérations au niveau de la jonction (Rass et al., 2012).

La voie de réparation NHEJ est un mécanisme important de la réponse immunitaire. Elle est indispensable d'une part lors de la commutation isotopique et lors de la recombinaison V(D)J. Ces mécanismes ont lieu pendant le développement des cellules lymphoïdes T et B et permet la diversité des récepteurs T et des immunoglobulines. La première étape est l'introduction de cassures double brins aléatoires par les nucléases Rag1 et Rag2 au niveau des segments codant « Variable, Diversity et Joining ». La réparation par la voie NHEJ va introduire des mutations au niveau du site de coupure permettant la diversité du répertoire des récepteurs aux antigènes, important dans la réponse immunitaire (Verkaik et al., 2002) (Bassing et al., 2002).

(2) DNA-PK

Membre de la famille des Phosphatidylinositol-3-OH Kinase related Kinase (PIKK) avec ATM et ATR, la DNA-PK est une enzyme composée d'une sous unité catalytique, la DNA-PKc et de l'hétérodimère Ku70-Ku80. Ces trois membres sont très abondants dans la cellule, de l'ordre de 4.10^5 molécules par cellule.

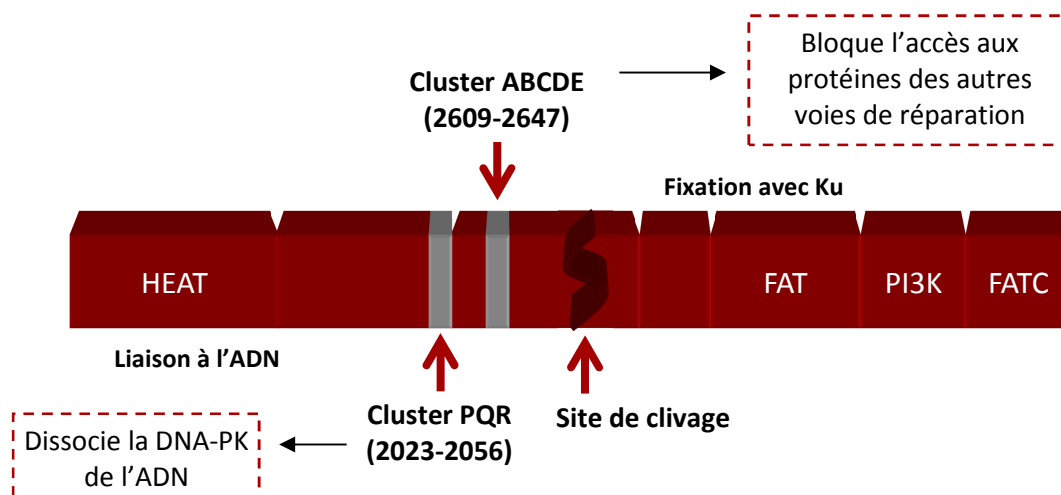


Figure 29 : Structure fonctionnelle de la DNA-PKc.

La DNA-PKc présente plusieurs domaines indispensables pour son activité et pour la promotion de la NHEJ et notamment deux clusters de phosphorylation.

La DNA-PKc est une sérine thréonine kinase de 4128 acides aminés. Elle se compose de différents domaines, communs aux PIKK (Figure 29). Le domaine N-terminal forme une hélice alpha contenant des répétitions HEAT qui va donner une structure circulaire à la protéine. Dans cette région se trouve le domaine de liaison à Ku et à l'ADN et la structure circulaire va faciliter cette liaison. Le domaine C-terminal contient un domaine kinase bien conservé dans la famille des PI3K, entouré des domaines FAT (FRAP, ATM and TRRAP domain) et FATC (FAT C-terminal domain) qui sont importants pour l'activité catalytique de la protéine (Sibanda et al., 2010). Elle contient également des clusters de sites de phosphorylation (Cui et al., 2005).

Les protéines Ku70 et Ku80 font respectivement 609 et 732 acides aminés. Le domaine C-terminal de Ku70 contient un domaine d'interaction avec la chromatine qui lui confère une très grande affinité pour l'ADN. Le domaine C-terminal de Ku80 contient un domaine d'hélice globulaire nécessaire aux interactions protéiques. L'extrémité du domaine C-terminal interagit avec la DNA-PKc (Dobbs et al., 2010).

Le recrutement de la DNA-PKc au niveau des extrémités de l'ADN par Ku induit des changements de conformation qui permettent sa fixation sur les brins d'ADN (Dobbs et al., 2010). Comme les autres membres de la famille des PIKK, la fixation de DNA-PK sur les extrémités d'ADN permet son activation. DNA-PK va alors phosphoryler ses substrats et notamment elle-même (Cui et al., 2005). Les substrats de DNA-PK sont peu connus. La plupart d'entre eux sont impliqués dans la réparation de l'ADN et ont été mis en évidence *in vitro*. Cependant, mis à part Artémis et la DNA-PKc elle-même, ils n'ont pas été confirmés *in vivo* (Ma et al., 2005).

Deux clusters de site d'autophosphorylations nécessaires à l'activité de la DNA-PK ont été mis en évidence : les résidus serines et thréonines des positions 2023 à 2056 forme le cluster PQR et les serines et thréonines entre les résidus 2609 à 2647 forment le cluster ABCDE (Figure 30). Ces clusters contiennent respectivement 5 et 6 sites consensus.

- La phosphorylation du cluster PQR et notamment de la sérine 2056 empêche l'accès des brins d'ADN aux nucléases et aux protéines de

résection. Lorsque la sérine 2056 est mutée, il a été observé une augmentation de la voie de la recombinaison homologue, car les extrémités d'ADN sont rendues accessibles aux protéines de résection (Cui et al., 2005).

- La phosphorylation du cluster ABCDE entraîne un changement de conformation de DNA-PK et va permettre l'ouverture du domaine de liaison à l'ADN. DNA-PK va alors se dissocier de l'ADN et les autres acteurs de la voie NHEJ vont pouvoir accéder aux brins d'ADN et réparer. En effet, la mutation de la thréonine 2609 en alanine entraîne une radiosensibilité des cellules (Chan et al., 2002). De plus, la perte du site ABCDE entraîne un phénotype plus délétère que l'inhibition de la DNA-PK elle-même. Les auteurs proposent l'hypothèse que le maintien de la fixation de DNA-PK aux extrémités des brins empêche l'accès aux protéines des voies de la RH ou de la Alt-NHEJ (Cui et al., 2005).

Le site de phosphorylation sérine 2056 ne peut être phosphorylé que par DNA-PK tandis que le site thréonine 2609 peut être en plus phosphorylé par ATM et ATR (Chan et al., 2002). De plus, DNA-PK phosphorylée colocalise avec les protéines γ H2AX et 53BP1 au niveau des sites de cassures de l'ADN. La phosphorylation de l'un de ces sites est donc un bon marqueur pour mesurer l'activité de la DNA-PK.

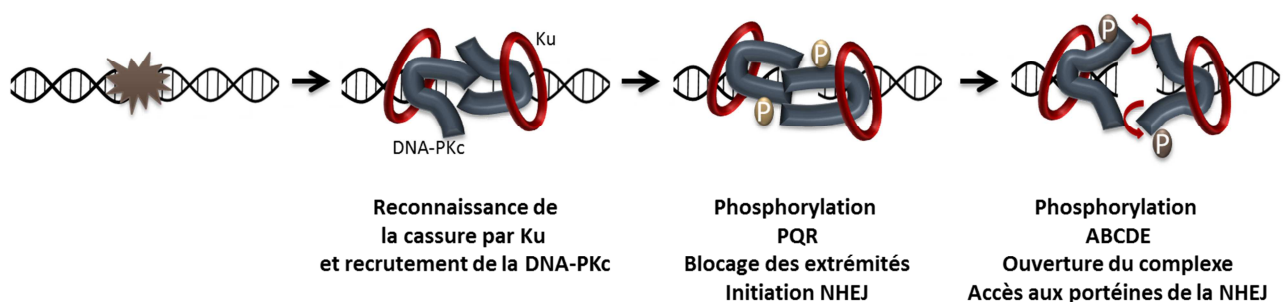


Figure 30 : L'autophosphorylation de DNA-PK est indispensable pour promouvoir la NHEJ

L'autophosphorylation de la DNA-PK sur la sérine 2056 et la thréonine 2609, induit des changements de conformation de la protéine qui vont lui permettre d'une part d'inhiber la RH et, d'autre part, de rendre les brins d'ADN accessibles aux protéines de la NHEJ.

Plus récemment, des expériences de protéomique ont mis d'autres sites de phosphorylation et d'acétylation en évidence sur la DNA-PK mais leurs rôles sont encore inconnus (Dobbs et al., 2010).

De façon intéressante, la DNA-PKc contient un site de clivage par les caspases. Ceci suggère que cette protéine peut être sensible à une protéolyse séparant le domaine kinase du domaine de liaison à l'ADN. En effet, en réponse à un stress dû à une trop grande concentration cellulaire, ou à des drogues comme l'étoposide ou la staurosporine ou encore à une apoptose induite par Fas, la DNA-PKc peut être clivée au niveau de ce site. Ce clivage entraîne l'apparition de deux fragments, l'un de 250 et l'autre de 160 KDa (Han et al., 1996). Ce même type de clivage a également été mis en évidence dans les protéines de réparation PARP et Rad51 (Flygare et al., 1998). Ainsi il semble que la dégradation des acteurs de la réparation de l'ADN soit caractéristique de l'apoptose.

Les protéines phosphatases PP2A(C), PP5 et PP6 (PP6CR1, PP6CR2 et PP6CR3) permettent la régulation de la DNA-PK. Il a été montré que l'interaction entre ces phosphatases et DNA-PK augmente après traitements génotoxiques. Un déficit de l'une de ces trois phosphatases entraîne une sensibilité accrue aux irradiations (Wang et al., 2009).

Au vu du nombre très important de molécules DNA-PKc, Ku70 et Ku80 dans une cellule, comparé à la quantité beaucoup plus modeste des autres membres de la voie NHEJ, et de leur localisation dans le cytoplasme et dans les rafts lipidiques, il a été proposé que la DNA-PK participe à d'autres fonctions. Ainsi, elle a été mise en évidence un rôle dans :

- La régulation de la radiosensibilité par son action sur la Cycline D1 via Akt et GSK3 β (Glycosidase Synthase Kinase 3 beta) (Kong et al., 2011).
- La réponse inflammatoire. DNA-PK est nécessaire pour l'activation de NF- κ B après irradiation. NF- κ B va induire la transcription du gène *Vcam-1* (Vascular Cellular Adhesion Molecule 1) important dans le recrutement des lymphocytes T helper (Ju et al., 2010). De plus, DNA-PK active une

voie de signalisation pro-inflammatoire en réponse au CD158d, un marqueur des cellules Natural Killer (Rajagopalan et al., 2010).

- La reconnaissance de l'ADN cytoplasmique et l'activation de la voie Rig1/TBK1. DNA-PK phosphoryle IRF3 (Interferon Regulatory Factor 3) après une infection virale ce qui permet la production d'interférons et la réponse inflammatoire (Karpova et al., 2002) (Ferguson et al., 2012).
- La régulation de gènes. DNA-PK interagit avec USF (Upstream Stimulating Factor), un régulateur de transcription du gène *fas* (Fatty Acid Synthase), important dans la lipogenèse (Kong et al., 2011).

Les protéines Ku70 et Ku80 ont également des rôles indépendants de DNA-PK.

- Elles interviennent dans la réplication de l'ADN et la prolifération des cellules. Il a été observé que les souris Ku80^{-/-} ont un défaut de croissance (Nussenzweig et al., 1996). De plus, l'inhibition de Ku80 dans la lignée cellulaire HCT116 induit une inhibition de la prolifération en prolongeant la phase G1. Il a également été montré que les protéines Ku interagissent avec les sites d'origine de la réplication de l'ADN et les activent (Sibani et al., 2005).
- Dans le cytosol, Ku70 interagit avec la protéine pro-apoptotique Bax et empêche sa relocalisation à la mitochondrie, inhibant ainsi l'apoptose de la cellule (Sawada et al., 2003).
- Les protéines Ku ont également un rôle dans la régulation des télomères, indépendant de son rôle dans la réparation de l'ADN. Elles permettent de protéger les extrémités de la nucléolyse en recrutant et stabilisant les télomérases (Downs and Jackson, 2004).
- Ku interagit avec la machinerie de transcription et peut également agir comme cofacteur de transcription (Downs and Jackson, 2004). Elles interagissent avec l'ARN polymérase II au niveau des sites d'élongation et apparaissent comme importantes dans la maintenance globale de la transcription (Mo and Dynan, 2002).

c. La voie NHEJ alternative (Alt-NHEJ)

L'analyse de la cinétique de réparation a mis en évidence l'existence d'une voie de réparation complémentaire de la voie NHEJ, indépendante de la RH. En effet, des cellules irradiées déficientes pour des protéines de la NHEJ (avec ou sans inhibition des protéines de la RH) ont la capacité de réparer les cassures de l'ADN mais avec une cinétique beaucoup plus lente (de 2 à 20 heures) (Wang et al., 2003). La surexpression des protéines de la voie de la RH ne restaure pas la cinétique normale de réparation ce qui montre l'existence d'une autre voie de réparation des cassures doubles brins de l'ADN (Wang et al., 2001) (Wang et al., 2003). Cette voie est appelée NHEJ alternative ou Backup-NHEJ pour être différenciée de la NHEJ classique (aussi appelé D-NHEJ, pour DNA-PK dependent NHEJ, du fait de la stricte nécessité de la DNA-PK).

Cette voie peut être utilisée dans toutes les phases du cycle cellulaire. Dans un contexte normal, elle représente environ 10 % des événements de réparation de cassure double brins de l'ADN (Guirouilh-Barbat et al., 2007) (Guirouilh-Barbat et al., 2004).

Cette voie partage un mécanisme commun avec la RH, modulée par les protéines DNA-PK et CtIP (Bennardo et al., 2008). En absence de DNA-PK au niveau des cassures d'ADN, MRN et CtIP forment des extrémités 3' débordantes qui vont être utilisées par la RH ou la Alt-NHEJ (Perrault et al., 2004) (Liang et al., 2005). Ces deux mécanismes nécessitent la présence d'homologies pour lier les extrémités des brins d'ADN. La RH nécessite une longue homologie sur les chromatides sœurs tandis que la Alt-NHEJ nécessite des homologies courtes (appelées microhomologies) sur des séquences proches du site de cassure (Figure 31) (Wyman and Kanaar, 2006).

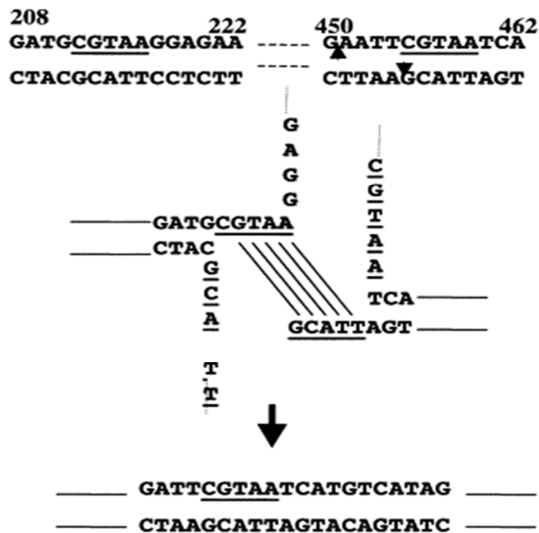


Figure 31 : Mécanismes d'utilisation des microhomologies

Les microhomologies sont des séquences homologues de 4-6 pb qui vont s'hybrider. Elles sont nécessaires pour la réparation par la Alt-NHEJ mais induisent des délétions entre les sites d'hybridation.

(D'après Rassool, 2003)

Peu de choses sont connues sur les partenaires de la Alt-NHEJ mais différentes études ont montré que cette voie utilise un mécanisme et des partenaires totalement différents de la voie classique (Figure 32).

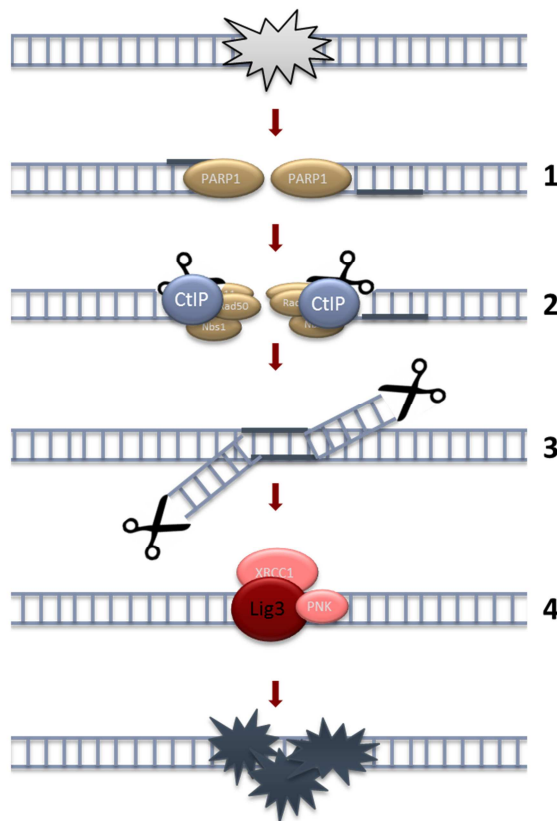


Figure 32 : La voie NHEJ Alternative

Cette voie de réparation se met en place uniquement en absence des protéines de la NHEJ. (1) Le senseur PARP1 reconnaît la cassure double brin et recrute (2) les nucléases MRN et CtIP. Celles-ci vont générer des extrémités débordantes qui vont s'hybrider au niveau de séquences homologues du même brin (3). Les séquences non hybridées sont ensuite clivées par une nucléase non connue à ce jour. (4) La ligase III avec ses co-facteurs XRCC1 et PNK ligature les brins. La séquence générée présentera des délétions plus ou moins importantes au niveau du site de cassure.

La Alt-NHEJ est initiée par le senseur PARP1 qui reconnaît les extrémités restées libres et forme la synapse de réparation (Audebert et al., 2004). Puis, comme dit

précédemment, elle est initiée par une résection dirigée par le complexe MRN-CtIP (Bennardo et al., 2008).

L'étape suivante est l'hybridation de courtes séquences. En effet, le séquençage des jonctions qui ont été formées par le mécanisme de la Alt-NHEJ montre l'utilisation de microhomologies qui sont des alignements de 2 à 4 nucléotides situés de part et d'autre de la cassure double brins (Feldmann et al., 2000). Puis les extrémités sortantes non hybridées sont clivées ce qui entraîne la création de délétions plus ou moins importantes (Guirouilh-Barbat et al., 2004) (Verkaik et al., 2002).

Des expériences de re liaison de plasmide ont permis de mettre en évidence le rôle de la ligase III et de XRCC1 dans cette voie (Audebert et al., 2004). XRCC1 sert de protéine plateforme et stabilise la ligase III. Plus récemment, une autre protéine de la voie a été mise en évidence, PNK (PolyNucleotide Kinase) qui interagit avec la ligase III et XRCC1 (Audebert et al., 2008).

La création de délétions observées rend la Alt-NHEJ beaucoup moins fiable que la NHEJ classique. En absence de DNA-PKc ou des protéines Ku, les cellules présentent une instabilité génomique importante. Ainsi, l'utilisation de la Alt-NHEJ induit des réarrangements chromosomiques importants comme des translocations ou des aberrations du fait de la lenteur du mécanisme (Ferguson et al., 2000) (Difilippantonio et al., 2000) (Gao et al., 2000) (Zhang et al., 2010). En effet, plus les extrémités d'ADN restent libres longtemps plus elles peuvent interagir avec d'autres extrémités libres créés par l'irradiation ou d'autres processus. L'analyse des points de jonction de translocations dans différentes tumeurs fait apparaître l'utilisation de microhomologies (Stephens et al., 2009).

d. Le choix des voies de réparation

(1) Compétition entre NHEJ et Alt-NHEJ

La NHEJ est strictement dépendante de la DNA-PK. Le nombre de molécule DNA-PK dans la cellule et son affinité importante pour les extrémités des brins d'ADN

rendent la NHEJ prioritaire pour la réparation des cassures doubles brins. La fixation de DNA-PK sur les extrémités d'ADN empêche leur résection par MRN et CtIP, ce dernier pouvant également agir indépendamment de BRCA1 (You and Bailis, 2010) (Bothmer et al., 2010). Ceci explique l'utilisation majeure de la voie NHEJ classique comparée à la Alt-NHEJ. Des expériences utilisant des doses croissantes de l'inhibiteur de la DNA-PK, wortmannin, ont montré que la stœchiométrie entre le nombre de molécule de DNA-PK et le nombre d'extrémités libres de l'ADN est un facteur important. En effet, s'il y a plus de cassures que de protéines DNA-PK, les extrémités libres vont être réparées par un mécanisme indépendant de la NHEJ (Perrault et al., 2004).

Les senseurs PARP1 et DNA-PK sont en compétition au niveau des sites de cassure de l'ADN. En absence de Ku, les extrémités d'ADN sont directement accessibles à PARP1 ce qui explique l'efficacité de la voie Alt-NHEJ dans ce contexte (Wang et al., 2006).

(2) Compétition entre RH et NHEJ

Il apparaît que le choix de l'utilisation de la voie de la RH ou de la NHEJ est dépendant du cycle cellulaire. En effet, les cellules déficientes pour les protéines de la voie NHEJ sont plus sensibles aux irradiations quand elles sont en phase G1 et début de phase S tandis que les cellules déficientes pour la voie de la RH sont sensibles aux IR quand elles sont en G2/M (Rothkamm et al., 2003). Ainsi la voie NHEJ est active tout au long du cycle cellulaire mais majoritaire en phase G0-G1 tandis que la voie de la RH est majoritaire dans les phases S/G2 du cycle cellulaire.

Les acteurs de la NHEJ se mettent en place en premier, puis sont inhibés en phase S/G2 pour que la RH soit utilisée en priorité (Allen et al., 2002). Pendant la phase S/G2 où la RH est utilisée, 53BP1 qui est exprimé tout au long du cycle cellulaire est inhibé par BRCA1 (Bunting et al., 2010) (Bouwman et al., 2010). La façon dont BRCA1 inhibe 53BP1 n'est pas encore très claire mais cette inhibition semble avoir lieu directement au niveau des cassures doubles brins. L'absence de 53BP1 (en

présence ou non de BRCA1) induit l'utilisation de la voie de la RH. L'action de 53BP1 et BRCA1 dans l'équilibre entre la RH et la NHEJ est très spécifique et elles ne peuvent agir sur d'autres partenaires. En effet, en absence de BRCA1, 53BP1 n'est pas inactivé par BRCA2 ou XRCC2, et inversement une déficience pour la ligase IV ou la DNA-PKc n'induit pas la RH (Bouwman et al., 2010). Il n'y a donc pas d'interaction génétique entre BRCA1 et 53BP1 et d'autres membres des voies de réparation ce qui montre que 53BP1 et BRCA1 exercent leur influence avant l'engagement dans une voie de réparation.

De plus, certaines protéines de la RH sont exprimées ou activées uniquement en phase S/G2. C'est le cas pour l'expression de Rad54 et CtIP (Yu and Baer, 2000) et pour l'activation de BRCA2 (Chen et al., 2008) et CtIP (Buis et al., 2012) (Yu and Chen, 2004).

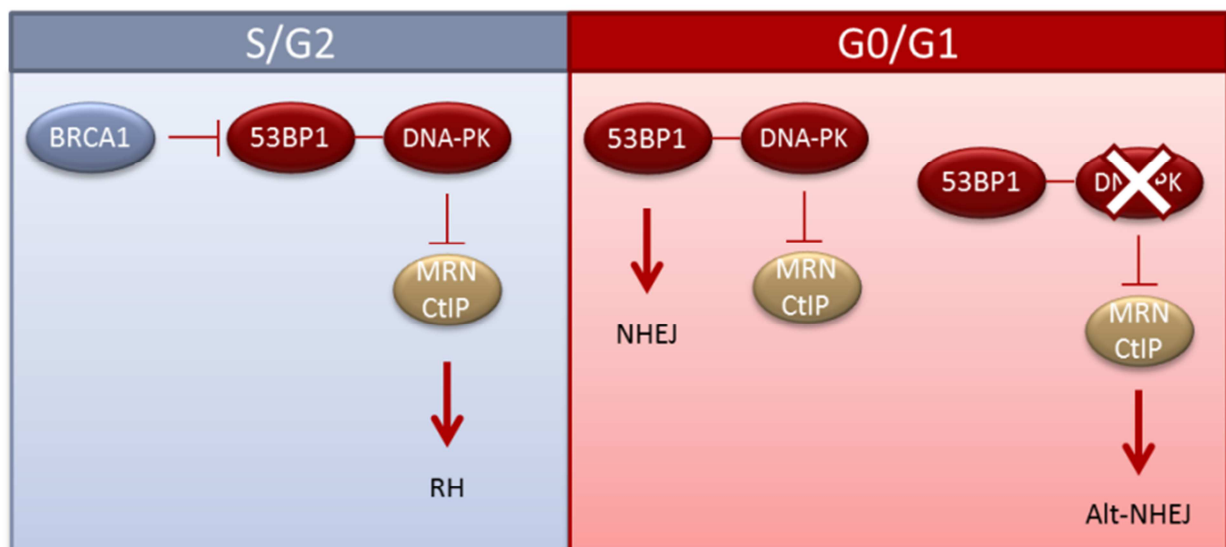


Figure 33 : Compétition entre les différentes voies de réparation

DNA-PK et 53BP1 s'organisent en premiers autour du site de cassure et inhibent la résection des brins d'ADN pour promouvoir la NHEJ. Durant les phases S/G2, BRCA1 va être exprimé et inactiver 53BP1. MRE11 et CtIP vont alors induire la résection des brins et promouvoir la RH. Durant les phases G0/G1 et seulement en absence de DNA-PK, la résection des brins initiée par MRN/CtIP entraîne l'activation de la Alt-NHEJ.

F. Réponse aux dommages de l'ADN dans les cellules souches

1. Résistance des cellules souches aux stress génotoxiques

Le fait que les cellules souches perdurent tout au long de la vie d'un individu augmente leur risque d'accumuler des mutations délétères. La maintenance de la stabilité génomique doit être très contrôlée dans les CS, car elles sont le départ de nombreuses lignées cellulaires. Pour faire face à des stress génotoxiques et pour éviter la transmission des dommages, les CS ont développé 3 stratégies majeures :

- Les cellules meurent par une apoptose massive, généralement dépendante de p53. C'est le cas des CS nerveuses et intestinales (Nowak et al., 2006) (Potten, 2004) (Hendry et al., 1997).
- Les mécanismes de réparation sont surexprimés et l'apoptose est diminuée. Les CS hématopoïétiques (détaillé dans le prochain paragraphe), épidermiques et germinales utilisent ce mécanisme (Mohrin et al., 2010) (Harfouche et al., 2010) (Menezo et al., 2007).
- Les CS se différencient de façon massive et précoce. C'est notamment le cas des CS de mélanocytes (Hakem, 2008).

2. Zoom sur les cellules souches hématopoïétiques

La moelle osseuse est l'un des premiers organes touchés après une irradiation du corps entier. En effet, les stress génotoxiques incluant les irradiations et les agents chimio-thérapeutiques induisent une suppression des cellules de la moelle osseuse par une apoptose massive des progéniteurs hématopoïétiques. Ces stress induisent aussi un défaut hématopoïétique à long terme dû à un défaut de CSH.

La CSH a développé plusieurs stratégies pour se protéger des dommages de l'ADN. Ses premières défenses sont sa localisation dans la niche qui lui procure un microenvironnement spécifique où l'hypoxie restreint la production des ROS, et son statut quiescent qui va limiter les erreurs liés à la réplication (Rossi et al., 2007).

L'analyse de patients ou de modèles murins ayant des mutations des protéines de la reconnaissance des cassures ou des voies de réparations montre l'importance du maintien de l'intégrité génomique pour la préservation de l'auto-renouvellement des CSH. Ainsi, comme présenté dans le Tableau 4 : Effet de quelques mutations touchants les voies de réponse aux dommages de l'ADN sur la fonction et la maintenance des CSH, un déficit à n'importe quel niveau de la réponse aux dommages de l'ADN entraîne des défauts de fonctionnalité ou de quiescence des CSH.

Peu de choses sont connues sur les mécanismes de réparation utilisés par les CSH pour réparer les cassures doubles brins. De plus, les résultats observés sont contradictoires chez l'homme et chez la souris et entre certaines études chez l'homme.

Milyavsky et al. montrent que les $CD34^+CD38^-$, enrichies en CSH, ont un niveau d'apoptose plus élevé que les progéniteurs $CD34^+CD38^+$ et un niveau faible de réparation après une irradiation de 3 Gy (Milyavsky et al., 2010). Ainsi ces cellules favorisent une apoptose plutôt que la réparation des dommages. De plus, des études *in vitro* testant la voie NHEJ sur des extraits nucléaires de $CD34^+CD38^-$ et $CD34^+CD38^+$ ont montré que les CSH utilisent moins cette voie que les cellules plus matures. En comparant l'expression des différents gènes de la NHEJ, les auteurs montrent que les CSH humaines ont une diminution de la ligase IV ce qui entraîne une diminution de l'utilisation de cette voie pour réparer les cassures d'ADN (Shao et al., 2012).

A l'inverse, Bracker et al montrent que la réparation des brins d'ADN et la résistance aux drogues sont plus importantes dans les cellules $CD34^+ CD38^-$, que dans les cellules plus matures $CD34^-$ ou les progéniteurs $CD34^+ CD38^+$ (Bracker et al., 2006). Ainsi ici, les CSH favorisent la réparation plutôt que l'apoptose.

Voie ciblée	Gène	Modèle	Phénotype des CSH	Références
DDR	ATM	Syndrome Ataxie Télangiectasie	Perte précoce des CSH Défauts fonctionnels	(Ito et al., 2004)
		Souris ATM ^{-/-}		
	ATR	Syndrome de Steckel		(Ruzankina et al., 2007)
		Souris ATR ^{-/-}		
	P53	Souris p53 ^{-/-}	Augmentation du nombre de LSK fonctionnels due à une diminution de l'apoptose. Radiorésistance	(Liu et al., 2009)
		Souris p53 ^{+/-m} (surexpression de p53)	Vieillesse précoce Perte précoce des CSH	
RH	Rad50	Rad50s/s	Augmentation de l'apoptose Défaut de fonctionnalité	(Bender et al., 2002)
	FANC	Syndrome Fanconie	Pancytopenie due à une diminution des CSH et des progéniteurs Hypersensibilité aux agents réplicatifs Prédisposition aux leucémies et aux myélodysplasies	(Milsom et al., 2009)
		Souris KO FancD2/FancC/FancA	Diminution du nombre Hypersensibilité aux agents réplicatifs	(Parmar et al., 2010)
	BRCA2	Souris BRCA2 ^{-/-}	Epuisement du stock avec l'âge Accumulation de dommages	(Prasher et al., 2005)
	Bmi1	Souris Bmi1 ^{-/-}	Sensible aux agents génotoxiques Forte instabilité génomique post traitements	(Chagraoui et al., 2011)
			Perte des CSH qui conduit à une déplétion de la moelle osseuse	
NHEJ	Lig4	Lig4 ^{Y288C}	Immunodéficience Pancytopenie avec perte des CSH	(Nijnik et al., 2007) (Rossi et al., 2007)
	Ku70	Souris KO	Défaut d'autorenouvellement Perte de la fonction de reconstitution	
	Ku80		Apoptose Défaut de différenciation	
	DNA-PK	SCID (DNA-PK non fonctionnelle)	Diminution du nombre	(Qing et al., 2012)
		KI DNA-PK S2609A	Diminution HR et NHEJ Perte au niveau foetal	(Zhang et al., 2011)

Tableau 4 : Effet de quelques mutations touchants les voies de réponse aux dommages de l'ADN sur la fonction et la maintenance des CSH

Mohrin et al. ont observé dans les CSH murines une augmentation des gènes de survie après une irradiation de 2Gy qui inhibent les gènes de l'apoptose induits par p53, et un arrêt du cycle cellulaire par une augmentation de p21. Les progéniteurs sont plus sensibles à l'irradiation à cause d'une augmentation de la transcription des gènes pro-apoptotiques induites par p53 (Meijne et al., 1991) (Mohrin et al., 2010). Les CSH qui sont quiescentes utilisent principalement la voie NHEJ pour réparer les cassures de l'ADN alors que les progéniteurs qui sont en cycle et les CSH proliférantes utilisent la voie RH (Figure 34) (Mohrin et al., 2010). Ce résultat a été confirmé *in vitro* grâce à des tests de reliaison de plasmides en comparant les LSK à des cellules plus matures (Shao et al., 2012). Mohrin et al. montrent également que l'utilisation de la voie NHEJ conduit à une instabilité génomique qui peut être transmise à la descendance et à un défaut fonctionnel des CSH après irradiation (Mohrin et al., 2010). Ainsi, pour éviter une perte du compartiment, les CSH réparent les cassures de l'ADN alors que les progéniteurs contenant des dommages sont plus soumis à l'apoptose (Mohrin et al., 2010).

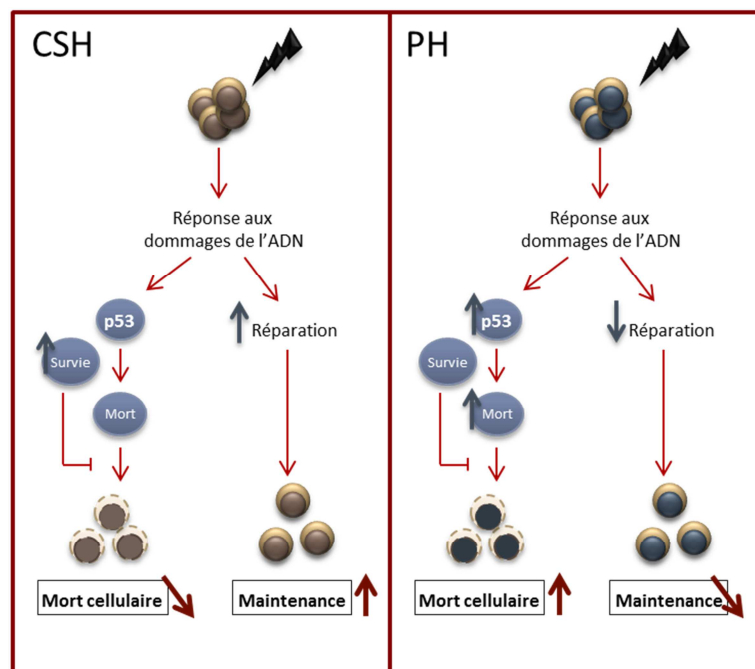


Figure 34: Réponses aux dommages de l'ADN dans les cellules souches et des progéniteurs hématopoïétiques murins.

Après un stress génotoxique, les cellules souches (CSH) et progéniteurs (PH) hématopoïétiques répondent différemment. Les CSH augmentent leur système de réparation NHEJ et diminuent l'apoptose induite par p53. Ce système permet d'éviter la perte des CSH. Alors que les progéniteurs hématopoïétiques meurent massivement par apoptose. (D'après Blanpain et al., 2011 et Mohrin et al., 2010).

Une autre étude a montré une augmentation de la sénescence dans les CSH après irradiation (Wang et al., 2010). Après une irradiation à 6.5 Gy, les auteurs observent une augmentation des marqueurs de sénescence β -galactosidase, p16 et p19 ainsi qu'une diminution du potentiel clonogénique des LSK. Ainsi les auteurs proposent que la diminution de la fonctionnalité des CSH après irradiation peut-être dû à une augmentation de la sénescence dans ce compartiment. La sénescence induite par des irradiations non létales est due à une augmentation des ROS spécifiquement dans le compartiment des CSH. Les ROS induisent des cassures de l'ADN, une perte du potentiel clonogénique et l'entrée en sénescence mais pas d'apoptose des CSH. Le traitement des souris irradiées avec un antioxydant diminue la perte de fonction des CSH induite par les irradiations (Wang et al., 2010).

Simonnet et al. ont mis en évidence un changement phénotypique des CSH après exposition des souris aux irradiations. Les CSH ont une augmentation transitoire de Sca-1 et une diminution du KIT à l'intérieur du compartiment SP. Dix semaines après irradiation, ils ont observé une diminution des LSK-CD150⁻Flk2⁺ liée à une augmentation des LSK-CD150⁺Flk2⁻. Les LSK-CD150⁺ perdent leur capacité à reconstituer due à une augmentation de l'apoptose et une accumulation de dommages de l'ADN (Simonnet et al., 2009).

Projet de Thèse

Nous avons vu que la thrombopoïétine (TPO) et son récepteur Mpl interviennent à différents niveaux de l'hématopoïèse : ils contrôlent d'une part la différenciation des mégacaryocytes et d'autre part l'auto-renouvellement et la quiescence des CSH. D'autres cytokines ne peuvent remplacer la TPO dans ces fonctions ce qui suggère que la TPO active des voies de signalisation spécifiques dans les CSH. L'équipe s'intéresse depuis de nombreuses années aux voies de signalisation mises en jeu par le couple TPO/Mpl. Elle a montré que l'activation soutenue à long terme de la voie des MAPK joue un rôle majeur dans la signalisation TPO. Avant mon arrivée au laboratoire, l'équipe avait isolé le gène précoce *lex-1* (*ler3*) lors d'un crible visant à identifier sélectivement les substrats de ERK mis en jeu par la TPO dans les UT7-Mpl, une lignée cellulaire d'origine mégacaryoblastique et qui exprime le récepteur de la TPO, Mpl.

lex-1 (Immediate Early Response Gene X-1) autrement appelé *ler3*, *Dif2* ou encore *Gly96* (chez la souris) est un gène précoce induit rapidement après un stress. Ses stimuli sont nombreux : facteurs de croissances, rayons X, rayons ultraviolet, virus, stéroïdes et stimuli inflammatoires.

Mis en évidence en 1996 par l'équipe de Jung, il a été caractérisé dans des cellules de carcinome exposées à des radiations ionisantes (Kondratyev et al., 1996). Les auteurs ont montré que l'ARNm de *lex-1* était induit rapidement après irradiation avec un maximum à 15 min après exposition.

Le gène *lex-1* humain est situé sur le chromosome 6 en 6p21-3. Sa séquence est bien conservée entre les espèces murines et humaines. Chez l'homme, il possède deux exons et un intron donnant une protéine de 156 acides aminés avec une taille de 20 kDa ou 27 kDa après glycosylation. IEX-1 est exprimée dans de nombreux tissus et de façon importante dans les cellules de la peau, des reins, du tube gastro-intestinal, de la prostate et de la vessie (Feldmann et al., 2001). Le promoteur de *lex-1* contient plusieurs séquences consensus pour les facteurs de transcriptions NF- κ B, p53, c-myc et SP1 (Schäfer et al., 1998). Cependant, l'action de ces différents facteurs de transcription est controversée et semble une fois encore dépendre du type cellulaire. Il a cependant été confirmé l'importance de ces facteurs de transcription dans l'expression de *lex-1* et il semble que ce soient les différentes

combinaisons des facteurs de transcription qui modifient la régulation de IEX-1 (Huang et al., 2002).

Le rôle de IEX-1 n'est pas bien défini et il semble participer à un ensemble de processus cellulaires (Figure 35). IEX-1 a un rôle dans la survie cellulaire mais peut être pro-apoptotique ou anti-apoptotique selon le type de cellule utilisée et le stimulus (Garcia et al., 2002) (Schäfer et al., 1998). Elle favorise également la croissance cellulaire (Grobe et al., 2001). Plus récemment, il a été observé un rôle de IEX-1 dans la régulation de la production de ROS. En effet, une surexpression de IEX-1 diminue la production de ROS dans un contexte normal ou après exposition à un stimulus apoptotique (Shen et al., 2006). Un autre rôle de IEX-1 est son implication dans le système ubiquitine/protéasome en agissant comme corépresseur de la transcription de S5a et S1 qui sont des composants du protéasome 26S (Arlt et al., 2007) (Figure 35).

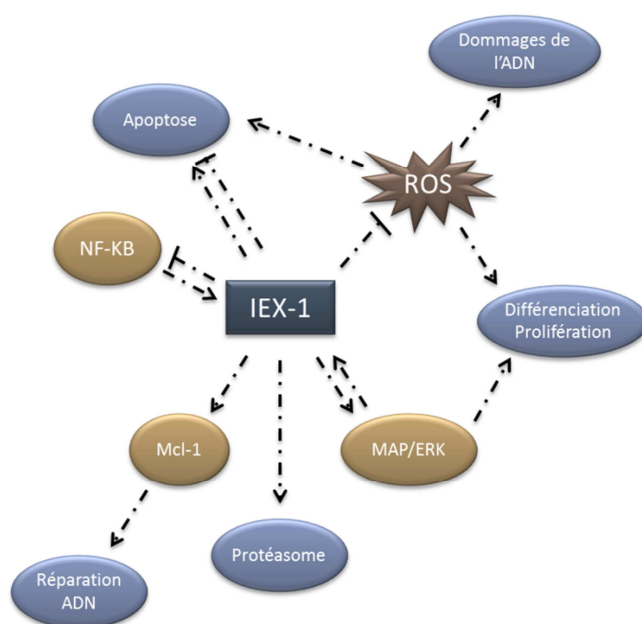


Figure 35 : IEX-1 est impliquée dans divers processus cellulaires

L'équipe a montré que IEX-1 est un substrat spécifique des ERK-1 et -2 et qu'elle les lie uniquement sous leur forme phosphorylée et activée, au niveau du site FTF de IEX-1 (Figure 36) (Garcia et al., 2002). Cette liaison entraîne la phosphorylation de IEX-1 sur la thréonine T18, lui conférant ainsi une fonction anti-apoptotique en réponse à des signaux de mort cellulaire (Garcia et al., 2002) et la capacité de

maintenir l'activation de ERK en réponse à des facteurs de croissance (Garcia et al., 2002) (Letourneux et al., 2006).

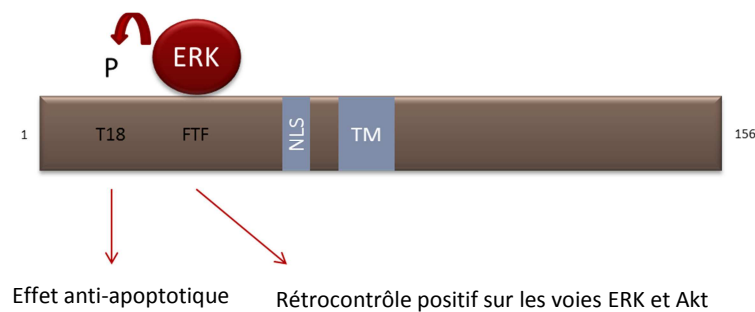


Figure 36 : Structure de IEX-1

Lorsque je suis arrivée au laboratoire, nous avons observé que IEX-1 est induite par la plupart des agents génotoxiques par une voie dépendante d'ATM, une kinase effectrice de la réponse aux dommages à l'ADN. Son expression entraîne sa relocalisation ainsi que celle de Mcl-1, une protéine de la famille de Bcl-2, dans le noyau. Ensemble, IEX-1 et Mcl-1 contrôlent la durée de l'arrêt en G2 pour permettre à la cellule de réparer son ADN. L'absence de l'une ou l'autre de ces protéines induit une forte instabilité génomique. De plus, les progéniteurs de moelle osseuse issus de souris *lex-1*^{-/-} présentent des cassures chromosomiques persistantes 2 mois après irradiation de ces souris à dose sous-létale (Figure 37 et Article Annexe1). IEX-1 semble donc nécessaire à la maintenance de l'intégrité génomique des cellules de la moelle.

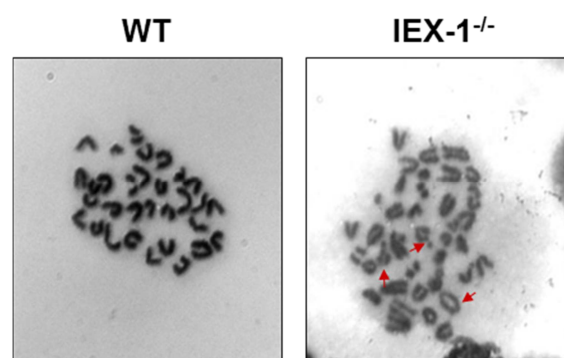


Figure 37 : Les souris déficientes pour *lex-1* présentent des aberrations chromosomiques persistantes deux mois après irradiation

*L'analyse cytogénétique de la moelle osseuse des souris *lex-1*^{-/-} révèle une augmentation du nombre d'aberrations chromosomiques comparé à des souris sauvages.*

Au cours de la culture *in vitro* de cellules CD34⁺ humaines issues de sang de cordon avec de la TPO, IEX-1 est détectée dans les cellules immatures et dans les mégacaryocytes, c'est-à-dire dans les compartiments qui répondent à la TPO (Figure 38). De plus, l'expression de *Iex-1* dans les UT7-Mpl est spécifique de la TPO puisque d'autres cytokines comme l'EPO ou le GM-CSF ne l'induisent pas. Dans ces cellules, la transcription de *Iex-1* est dépendante de la fixation du facteur de transcription AML-1 sur son promoteur lorsque celui-ci est phosphorylé et activé par ERK (Hamelin et al., 2006).

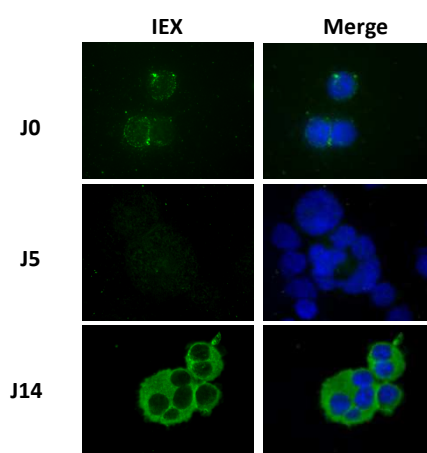


Figure 38 : IEX-1 est exprimé en réponse à la TPO

Immunofluorescence de IEX-1 (vert) dans les cellules CD34⁺ humaines puis lors de leur différenciation en TPO. IEX-1 est exprimé dans les cellules primitives et dans les mégacaryocytes

IEX-1 étant induit dans les CSH (Luckey et al., 2006) et de façon spécifique par la TPO dans les UT7-Mpl (Hamelin et al., 2006), ces résultats suggéraient que la TPO via la voie ERK-IEX-1 pourrait contribuer à la résistance des CSH aux dommages de l'ADN. J'ai étudié cette hypothèse au cours de ma thèse.

Dans un premier temps, j'ai mis en évidence le rôle de la TPO dans la réparation de l'ADN des CSH et dans un second temps l'importance du complexe ERK-IEX-1 dans cet effet.

Article 1

La TPO limite la mutagenèse et la perte de fonction à long terme des CSH induits par des dommages à l'ADN en stimulant une voie dépendante de la DNA-PK

Bérengère de LAVAL*, Patrycja PAWLIKOWSKA*, Laurence PETIT-COCAULT, Chrystèle BILHOU-NABERA, Geneviève AUBIN-HOUZELSTEIN, Michèle SOUYRI, Frédéric POUZOLET, Murielle GAUDRY, Françoise PORTEU

Thrombopoietin-increased DNA-PK-dependent DNA repair limits hematopoietic stem and progenitor cell mutagenesis in response to DNA damage.

***Cell Stem Cell.* 2013; 12(1):37-48**

A. Introduction

Dans la première partie de mon travail de thèse, je me suis intéressée au rôle de la TPO dans la stabilité génomique des CSH. Peu est connu sur les mécanismes utilisés par la CSH pour faire face aux dommages de l'ADN. Des études ont montré l'utilisation obligatoire de la voie NHEJ par ces cellules en réponse à des cassures double brins du fait de leur statut quiescent. Cependant cette voie de réparation est mutagène et les CSH présentent une instabilité génomique comparée aux progéniteurs radorésistants qui utilisent la voie de la recombinaison homologe.

Parce que la CSH est maintenue tout au long de la vie d'un individu et qu'elle est à l'origine de toutes les cellules de la moelle osseuse, les cassures double brins de l'ADN induites par des traitements radio- ou chimio-thérapeutiques lui sont très néfastes. En effet, le risque élevé de développer une leucémie myéloïde aigüe (LAM) et la perte de fonction résiduelle des CSH sont des facteurs limitant importants de ces thérapies. Une meilleure connaissance des réponses des CSH aux dommages de l'ADN est indispensable pour découvrir des moyens permettant d'améliorer la sécurité des traitements.

B. Résultats

Les souris $Mpl^{-/-}$ et notamment leur CSH sont plus sensibles aux irradiations que les sauvages. Plusieurs possibilités peuvent être la cause de cette radio-sensibilité, une augmentation de l'apoptose ou de la senescence et/ou un défaut de réparation de l'ADN. Les CSH $Mpl^{-/-}$ ne différenciant pas des CSH sauvages pour les deux premières possibilités, nous nous sommes intéressés à un défaut de réparation dans ces cellules. En effet, grâce à des marquages γ H2AX, un marqueur de formation des cassures double brins, et des tests de comètes qui mesurent spécifiquement les cassures double brins, nous avons montré que les CSH $Mpl^{-/-}$ ou $Mpl^{+/-}$ présentent des dommages accrus et un défaut de réparation après des traitements génotoxiques. Ce défaut conduit à une instabilité génomique dans les cellules de la moelle osseuse, observée par une augmentation d'aberrations chromosomiques.

Des défauts similaires sont reproduits lorsque des CSH de souris sauvages ou humaines sont traitées en absence de TPO.

In vivo, une unique injection de TPO ou de son agoniste Romiplostim avant irradiation ou traitement à la doxorubicine des souris sauvage, diminue la présence de foyer γ H2AX et de cassures chromosomiques à court terme (24h), mais aussi à long terme (10 semaines). Ni le SCF ni le Flt-3 ligand n'ont montré cet effet indiquant une spécificité de la TPO dans cette fonction. De plus, des expériences de reconstitution utilisant les CSH de souris traitées ou non avec de la TPO avant d'être irradiées montre que la TPO améliore leur capacité de prise de greffe.

Par ailleurs, nous montrons que la TPO n'influence pas la quiescence ou la prolifération des CSH. Pour comprendre comment la TPO agit sur la réparation de l'ADN, nous nous sommes intéressés aux différentes voies de réparation activées par des cassures double brins, et notamment à la voie NHEJ. L'inhibition de la DNA-PK, enzyme clé de cette voie, bloque la réparation de l'ADN normalement observée en réponse à la TPO. De plus, l'injection de TPO dans des souris NOD/SCID, qui présentent une mutation perte de fonction de DNA-PKc, n'a aucun effet sur la réparation des LSK. Ces expériences *in vitro* et *in vivo* nous permettent de conclure que la TPO agit sur la voie NHEJ pour promouvoir la réparation des CSH. Les cellules traitées avec ou sans TPO ont une même cinétique de formation de foci Rad51, un marqueur de la voie de la recombinaison homologue. De plus, la TPO n'améliore pas la réparation induite par un stress prolifératif. Ceci suggère que la TPO n'agit pas sur la voie de la recombinaison homologue.

Finalement, nous montrons que la TPO agit directement en augmentant la phosphorylation de la protéine kinase DNA-PK au niveau de la sérine 2056 et de la thréonine 2609 qui sont nécessaires à l'activité de la DNA-PK. Grâce à des plasmides clivés transfectés dans des cellules irradiées, nous montrons une efficacité diminuée des LSK $Mpl^{-/-}$ et $Mpl^{+/-}$ à réparer l'ADN par la voie NHEJ.

C. Conclusion

Dans cette étude, nous avons découvert une nouvelle fonction de la TPO dans le maintien de l'intégrité génomique des CSH en activant directement la voie de réparation NHEJ. Nos résultats montrent que les cytokines de la niche peuvent directement contrôler les voies de réparation de l'ADN des CSH. De plus, l'injection de TPO ou de Romiplostim juste avant irradiation protège l'intégrité génomique et la fonction des CSH à long terme. Ces résultats ouvrent des perspectives nouvelles pour l'utilisation des agonistes de la TPO comme adjuvant protecteur avant radio- ou chimiothérapie pour minimiser les risques de développement de leucémie aigüe myéloïdes secondaires. L'expression de Mpl étant haplo-insuffisante pour la fonction de réparation de l'ADN, ces résultats suggèrent que la mesure de l'expression de Mpl avant radiothérapie pourrait être utilisée comme facteur pronostic de risque de développement de leucémie aigüe myéloïdes ou de syndromes myélodysplasiques secondaires.

D. Article

Thrombopoietin-Increased DNA-PK-Dependent DNA Repair Limits Hematopoietic Stem and Progenitor Cell Mutagenesis in Response to DNA Damage

Béregère de Laval,^{1,2,3,8} Patrycja Pawlikowska,^{1,2,3,8} Laurence Petit-Cocault,⁴ Chrystèle Bilhou-Nabera,⁵ Geneviève Aubin-Houzelstein,⁶ Michèle Souyri,⁴ Frédéric Pouzoulet,⁷ Murielle Gaudry,^{1,2,3} and Françoise Porteu^{1,2,3,*}

¹Institut National de la Santé et de la Recherche Médicale U1016, Institut Cochin, 75014 Paris, France

²Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS) UMR 8104, 75014 Paris, France

³Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, 75014 Paris, France

⁴CNRS UMR 7622, Université Pierre et Marie Curie, 75005 Paris, France

⁵Service d'Hématologie et Immunologie Biologiques, Assistance Publique—Hôpitaux de Paris, Hôpital St. Antoine, 75012 Paris, France

⁶Institut National de la Recherche Agronomique UMR 955, Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Université Paris Est, 94704 Maisons-Alfort, France

⁷Plateforme de Radiothérapie Expérimentale, Institut Curie, 91400 Orsay, France

⁸These authors contributed equally to this work

*Correspondence: francoise.porteu@inserm.fr

<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.012>

SUMMARY

DNA double-strand breaks (DSBs) represent a serious threat for hematopoietic stem cells (HSCs). How cytokines and environmental signals integrate the DNA damage response and contribute to HSC-intrinsic DNA repair processes remains unknown. Thrombopoietin (TPO) and its receptor, Mpl, are critical factors supporting HSC self-renewal and expansion. Here, we uncover an unknown function for TPO-Mpl in the regulation of DNA damage response. We show that DNA repair following γ -irradiation (γ -IR) or the action of topoisomerase-II inhibitors is defective in *Mpl*^{-/-} and in wild-type mouse or human hematopoietic stem and progenitor cells treated in the absence of TPO. TPO stimulates DNA repair in vitro and in vivo by increasing DNA-PK-dependent nonhomologous end-joining efficiency. This ensures HSC chromosomal integrity and limits their long-term injury in response to IR. This shows that niche factors can modulate the HSC DSB repair machinery and opens new avenues for administration of TPO agonists for minimizing radiotherapy-induced HSC injury and mutagenesis.

INTRODUCTION

Double-strand breaks (DSBs) in genomic DNA are generated endogenously during replication or through exogenous treatments with genotoxic agents such as ionizing radiations. In mammalian cells, DSBs are removed by two main repair pathways: homologous recombination (HR) and nonhomologous end-joining (NHEJ). NHEJ is regarded as the predominant mechanism for DSB repair in vertebrates and in response to irradiation

(IR) (Iliakis et al., 2004). Central to NHEJ are the DNA-PK complex, composed of the DNA-PK catalytic subunit and the Ku80/Ku70 heterodimer, and the DNA Ligase IV/XRCC4/XLF complex. NHEJ is considered intrinsically error prone. However, although it frequently causes small alterations in DNA sequence around the break site, the classical NHEJ usually does not join unlinked DNA ends. In the absence of key canonical NHEJ components, a backup DNA-PK-independent version of NHEJ accounts for residual end-joining of DSBs and results in major genomic rearrangements, including chromosomal deletions and translocations like those at the origin of leukemia (Ferguson et al., 2000; Guirouilh-Barbat et al., 2004; Iliakis et al., 2004; Weinstock et al., 2007).

Bone marrow (BM) injury is one of the major limiting factors for cancer therapies that use DNA-damaging agents, such as IR and chemotherapeutic drugs. Besides acute myelosuppression, resulting from apoptosis of proliferating hematopoietic progenitor cells (HPCs) and reversible for nonlethal doses, IR induces residual BM injury due to loss of hematopoietic stem cell (HSC) reserves or functions (Shao et al., 2010; Simonnet et al., 2009; Wang et al., 2006). Moreover, DNA-damaging agent-induced risk of cancer is very high for the hematopoietic tissue. Indeed, secondary acute myeloid leukemia (AML) and myelodysplastic syndrome (MDS) are concerning complications of these therapies. Because they maintain hematopoiesis throughout their life span, HSCs have an increased risk of accumulating genomic anomalies. Maintenance of genomic integrity is also crucial for preservation of HSC self-renewal (Ito et al., 2004; Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007). Therefore, approaches for improving the safety of anticancer DNA agents require careful analysis of HSC response to DNA damage. Limited data are available on the mechanisms involved in DNA repair in HSCs. Recent data demonstrated that DSB repair through NHEJ is necessary for HSC maintenance, given that mice deficient for DNA Ligase IV or Ku80 display age-progressive loss of HSC functions (Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007). However, the obligatory use of NHEJ to repair IR-induced DNA damage in quiescent HSCs has been shown to promote high levels of mutagenesis (Mohrin

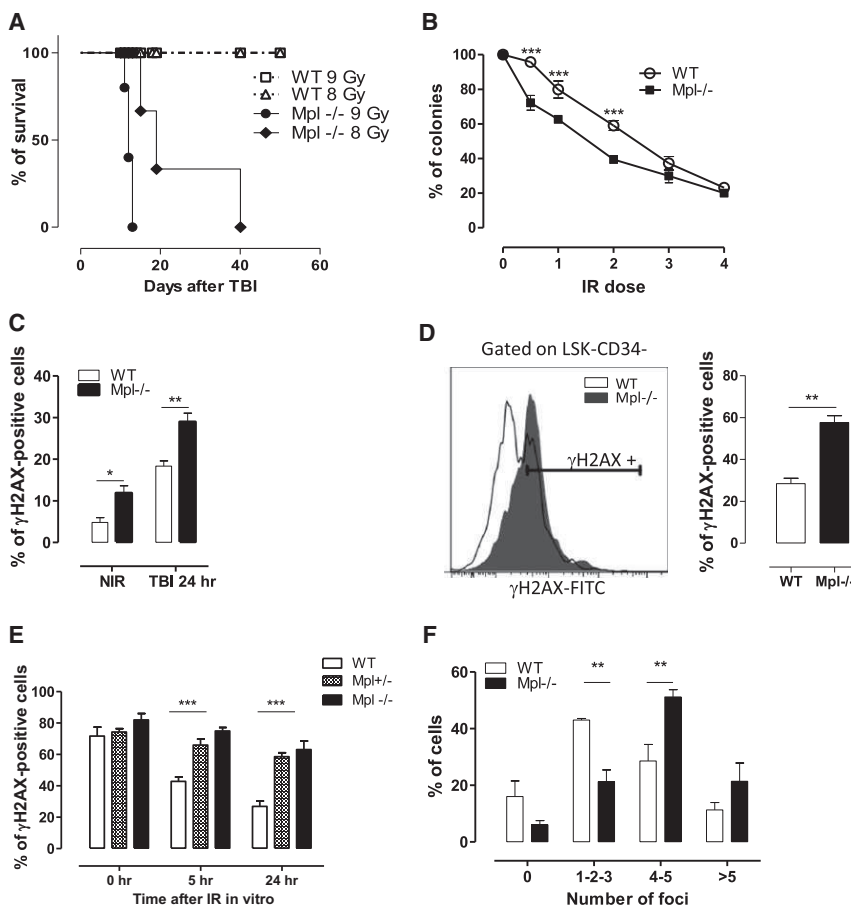


Figure 1. *Mpl* Loss Confers γ -IR Sensitivity and Impairs DNA Repair

(A) Survival Kaplan-Meier curves of 8-week-old WT and *Mpl*^{-/-} mice exposed to 8 and 9 Gy TBI (n = 3).

(B) In vitro LSK clonogenic assay. Means ± SEM of 7 day colonies after IR normalized to nontreated sample numbers are shown (n = 3).

(C and D) γH2AX foci expression in WT and *Mpl*^{-/-} HSPCs 24 hr following 2 Gy TBI or not (NIR).

(C) Percentage of LSK cells displaying more than three γH2AX foci. Means + SEM, n = 5 (NIR), n = 4 (IR). (D) γH2AX-positive LSK-CD34⁻ cells detected by flow cytometry. Means + SEM (n = 3) and representative histograms are shown.

(E and F) γH2AX-positive cells (E) and foci-number repartition (F) in *Mpl*^{-/-}, *Mpl*^{+/-}, and WT LSK cells irradiated (2 Gy) in vitro and cultured in complete medium for the indicated times. Means + SEM from three independent experiments on pools of three to five mice are shown. See also Figure S1.

RESULTS

Increased IR Sensitivity and Impaired DNA Repair in *Mpl*^{-/-} HSPCs

Previous studies have reported the difficulty of transplanting *Mpl*^{-/-} mice (Wicke et al., 2010). To analyze this further, we subjected wild-type (WT) and *Mpl*^{-/-} mice to various doses of total-body IR (TBI). The doses of 9 and 8 Gy were clearly sublethal for WT mice,

whereas they induced rapid death of all *Mpl*^{-/-} mice (Figure 1A). Clonogenic assays showed that *Mpl*^{-/-} Lin⁻Sca⁺Kit⁺ cells (hereafter referred to as HSPCs or LSK cells) were less resistant than WT LSK cells to low doses of IR, indicating a radiosensitive phenotype (Figure 1B). The dose of 2 Gy was chosen for further examination of this phenotype.

We then asked whether the lower radioresistance of *Mpl*^{-/-} HSPCs could be due to DNA repair defects. Thus, we first examined the presence of γH2AX nuclear foci, a commonly used surrogate marker of DSB formation. A slightly higher proportion of *Mpl*^{-/-} LSK cells expressed spontaneous γH2AX foci compared to WT cells, although this remained low. Twenty-four hours after TBI, a significantly greater number of WT LSK cells harbored γH2AX foci, and this number was further increased in *Mpl*^{-/-} mice (Figure 1C). The number of γH2AX foci detected by flow cytometry was also increased in *Mpl*^{-/-} HSC-enriched LSK-CD34⁻ cells (Figure 1D).

Second, we assessed DNA repair by analyzing γH2AX foci disappearance kinetics. Thus, LSK cells were irradiated in vitro and analyzed at various times of culture in a medium containing a cocktail of cytokines including TPO (complete medium). Maximum γH2AX foci formation was observed immediately after IR, and it was not significantly different between WT and *Mpl*^{-/-} cells. WT LSK cells had already started resolving their foci at 5 hr post-IR, and 62 ± 3% of cells harboring foci had disappeared at 24 hr. By contrast, at that time, the majority of

et al., 2010). HSCs are also regulated through interactions with the niche environment and growth factors controlling the balance between quiescence, proliferation, and differentiation. How these signals contribute to the HSC-intrinsic DNA repair process is currently unknown.

Thrombopoietin (TPO) and its receptor *Mpl* are master regulators of both megakaryopoiesis and HSCs. TPO has been shown to increase HSC interaction with the osteoblastic niche and to support HSC quiescence and expansion posttransplantation (Fox et al., 2002; Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007). Mice deficient for *TPO* or *Mpl* display increased HSC cycling and age-progressive loss (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007). Inactivating mutations of the *Mpl* receptor in humans cause thrombocytopenia and BM failure in early childhood, a syndrome called congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (CAMT) (Maserati et al., 2008), whereas mutations resulting in its constitutive activation are involved in myeloproliferative disorders (Pardanani et al., 2006). We show here that *Mpl*-deficient mice and HSPCs display increased radiosensitivity due to a defective repair function. We uncover a specific function of TPO in the regulation of HSC DNA damage response. TPO acts by increasing DNA-PK-dependent NHEJ repair efficiency. This shows that HSC environmental factors can control the DSB repair machinery to ensure chromosomal integrity and limit their long-term residual injury in response to IR.

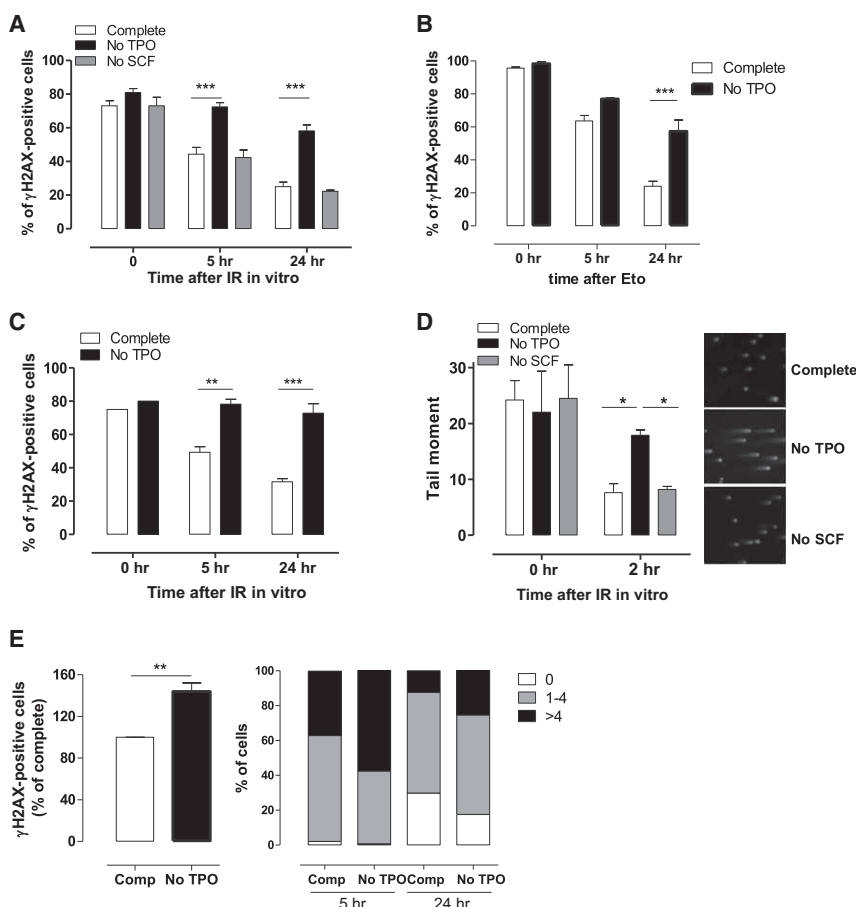


Figure 2. TPO Specifically Increases DNA Repair in Mouse and Human HSPCs In Vitro

(A–C) γ H2AX staining in LSK cells (A and B) and LSK-CD34⁺ cells (C) treated with 2 Gy IR (A and C) or 100 μ M etoposide (Eto) for 30 min (B) in vitro and cultured for the indicated times in complete medium or without TPO or SCF. Means \pm SEM of nine (A) or three (B and C) independent experiments on pools of three to five mice are shown. (D) Comet tail moment and representative pictures of Lin⁺ cells treated as in (A). Means \pm SEM of three independent experiments (nine mice per group). (E) γ H2AX foci in human CD34⁺C38⁺ cells after IR (2 Gy) and culture in complete medium or without TPO. Left: Cells expressing more than four γ H2AX foci 5 hr post-IR. Results are expressed as a percentage of positive cells in complete medium. Means \pm SEM, $n = 3$. Right: Foci-number repartition 5 and 24 hr after IR. A representative experiment is shown. See also Figure S2.

Mpl^{−/−} cells still stained positively for γ H2AX, and the majority of them contained four or more foci (Figures 1E and 1F), indicative of prolonged DNA damage in *Mpl*^{−/−} HSPCs. Interestingly, a similar defect was observed in *Mpl*^{+/−} cells (Figure 1E), indicating that the level of *Mpl* expression is critical for correct DNA repair in response to IR.

To analyze whether this persistent DNA damage resulted from defective DSB repair, we performed single-cell comet assays in neutral conditions that measure DSBs specifically. Just after IR, all the cells displayed comparable amounts of DNA breaks. However, whereas WT cells rejoined 2/3 of the breaks in 2 hr, the great majority of them remained unrepaired in *Mpl*^{−/−} cells (Figure S1A available online). In addition, when the extent of damage was quantified on a 0 (undamaged) to 3 (very damaged) scale according to the tail length, it appeared that the severity of IR-induced DNA damage was greatly enhanced in *Mpl*^{−/−} (Figure S1B).

TPO-Mpl Signaling Specifically Regulates DSB Repair in HSCs

To exclude the possibility that the constitutive lack of *Mpl* leads to increased DNA damage due to chronic changes, we analyzed the effect of acute TPO signaling upon IR. Thus, we switched the cells from the complete medium to the same medium containing all cytokines but TPO. The presence of TPO did not affect the maximum levels of γ H2AX foci or break formation, showing

that TPO did not prevent DNA damage. However, LSK cells irradiated and cultured in TPO-free medium were greatly impaired in their capacity to resolve γ H2AX foci (Figure 2A). Similar results were found by using etoposide and doxorubicin (DXR) for inducing DSBs (Figures 2B and S2A). DNA comet tail repair was also greatly altered in the absence of TPO (Figure 2D). The defects were similar in their extent to those observed with *Mpl*^{−/−} cells. Removal of TPO to *Mpl*^{−/−} LSK cell cultures had no effect (Figure S2B), showing that TPO acts through *Mpl* only. In agreement with the higher *Mpl* expression in HSCs than in progenitors (Qian et al., 2007), TPO had an even more striking effect in improving DNA damage resolution in LSK-CD34⁺ cells (Figure 2C). This indicates that the DNA repair defect of *Mpl*^{−/−} cells results from a specific loss of TPO signaling. TPO also increased γ H2AX foci disappearance in CD34⁺CD38[−] human HSPCs (Figures 2E and S2C) and in a human cell line expressing *Mpl*, UT7-*Mpl* (Figure S2D), which can be grown in erythropoietin (EPO) or TPO (Hamelin et al., 2006). Kinetics analysis indicated that the protective effect of TPO required the presence of TPO shortly before IR and was abolished when TPO was added to the medium after IR (data not shown).

TPO could also favor DNA repair in vivo. Indeed, TPO injection to WT but not to *Mpl*^{−/−} mice just before TBI or DXR treatment (Figure 3A) significantly reduced the number of LSK cells displaying γ H2AX foci at 5 or 16 hr compared to mice treated with PBS (Figures 3B and 3C). The TPO agonist Romiplostim (Léon et al., 2012) induced a similar effect (Figure 3B). As observed in vitro, an even more striking effect of TPO was observed in HSC-enriched LSK-CD34⁺ cells (Figure 3D).

In contrast with TPO, removal of stem cell factor (SCF; Figures 2A, 2D, and S2B) or Flt3 ligand (Flt3-L; data not shown) did not impair the kinetics of IR-induced γ H2AX foci or DSB

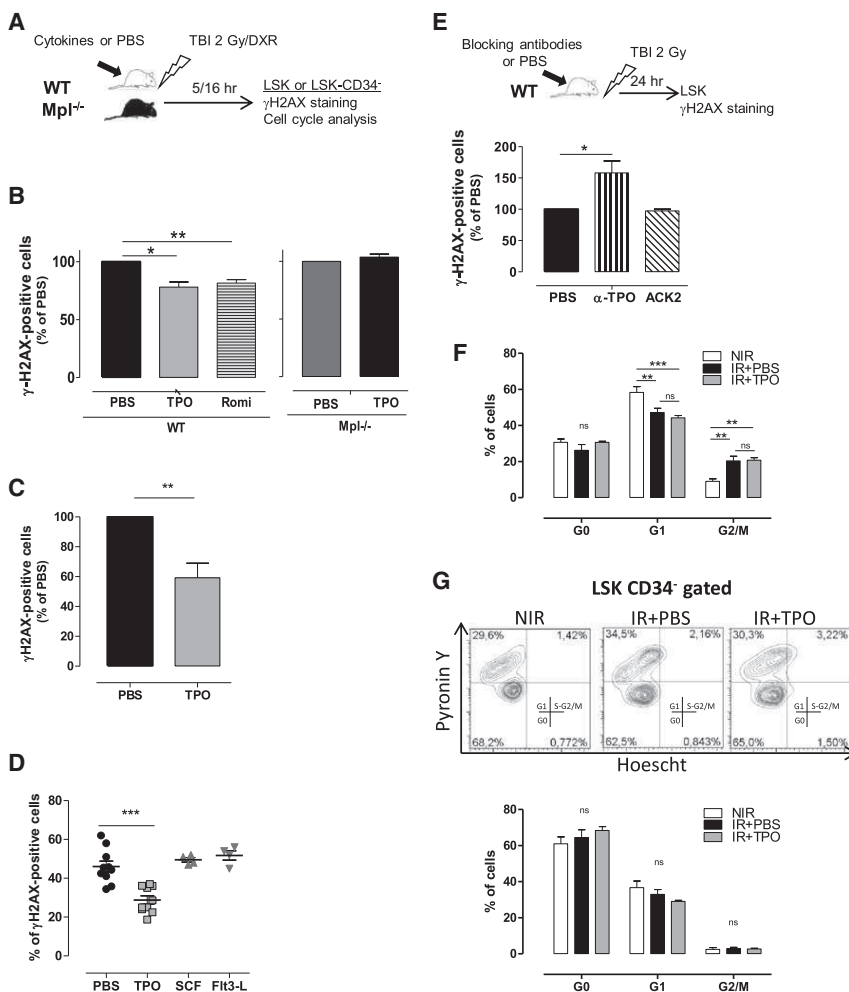


Figure 3. TPO Specifically Increases the DNA Repair In Vivo

(A) Experimental design for in vivo cytokines and DNA-damaging agent treatments. TPO (8 μ g/kg), Romiplostim (100 μ g/kg), SCF, or Flt3-L (50 μ g/kg) were injected 30 min before TBI (2 Gy) or DXR (4 mg/kg).

(B and C) γ H2AX staining in LSK cells isolated 5 hr after TBI (B) or 16 hr after DXR treatment (C). Results are normalized to the means of γ H2AX-positive cells from PBS-injected animals. Means + SEM (B, n = 5; C, n = 4).

(D) Means + SEM of γ H2AX-positive LSK-CD34⁻ cells 16 hr after treatment with the indicated cytokines and TBI. Each dot represents an individual mouse.

(E) γ H2AX staining in LSK cells treated 24 hr before with TPO (800 μ g/kg) or Kit (2 mg/kg) neutralizing antibodies and TBI (n = 5). Results are expressed as in (B).

(F and G) Cell-cycle distribution measured by Hoechst and Pyronin Y staining in LSK (F) or LSK-CD34⁻ (G) cells from mice treated as in (B). Means + SEM (n = 3) and representative flow-cytometry profiles are shown. ns, not significant. See also Figure S3.

disappearance in WT or *Mpl*^{-/-} LSK cells. Likewise, injection of SCF or Flt3-L (Hérodin et al., 2003) to mice before TBI did not reduce γ H2AX foci accumulation in LSK-CD34⁻ cells (Figure 3D). Injection of TPO-neutralizing antibodies significantly increased TBI-induced γ H2AX foci accumulation, whereas the c-Kit neutralizing antibody ACK2 (Xue et al., 2010) had no effect (Figure 3E). This indicates that TPO has a unique effect on HSC DNA-damage responses in vivo and in vitro. Confirming these results, HSPCs from *Kit*^{W^{-v}/W^{-v} mutant mice did not display increased DNA damage upon TBI (Figure S2E).}

In addition to defects in DNA repair, decreased DNA damage and radiosensitivity can result from altered apoptotic or cell-cycle responses. Thus, we next tested whether TPO signaling could also modulate these cellular outcomes after IR. WT and *Mpl*^{-/-} LSK cells showed similar degrees of caspase 3 and caspase 7 activation at 24 hr post-IR (2 Gy) in vitro (Figure S3A). Likewise, a low and similar percentage of WT and *Mpl*^{-/-} LSK cells isolated 5 hr (data not shown) or 24 hr (Figure S3B) after 2 Gy TBI stained positive for annexin V. Thus, the *Mpl*^{-/-} HSPC radiosensitivity is not due to increased IR-induced early apoptosis. Confirming these results, TPO had no effect on apoptosis of WT LSK cells 24 hr after IR in vitro (Figure S3C). Accordingly, induction of p53-dependent apoptotic genes

the LSK-CD34⁻ HSC population contains a majority of G0 quiescent cells and fewer proliferative cells than the LSK cell population (Figures 3F and 3G). Although TBI increased the number of LSK cells in S-G2/M, it has no significant effect on the total number of quiescent LSK and LSK-CD34⁻ cells. Importantly, TPO treatment pre-TBI did not alter the cell-cycle status of either LSK or LSK-CD34⁻ cells compared to PBS treatment, at a time when it already reduced γ H2AX foci. Similar results were observed at 16 hr post-TBI (Figure S3E). Moreover, expression of the cell-cycle regulators p57^{Kip2} and p27^{Kip1}, involved in HSC quiescence (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007), remained unchanged after TPO injection and TBI (Figure S3F). Likewise, although the proportion of quiescent LSK cells decreased significantly after 24 hr culture in vitro, the presence of TPO in the medium had no effect on this phenomenon (Figure S3G). For determining whether TPO could give more time to the cells to repair damaged DNA by slightly slowing down the cell cycle, cell-division history of LSK cells irradiated in vitro was also assessed using CFSE dilution assays. No difference was observed in cultures containing TPO or not, even at early time points (Figure S3H). Finally, we could not detect senescence by SA- β -galactosidase staining in WT or *Mpl*^{-/-} LSK cells (data not shown).

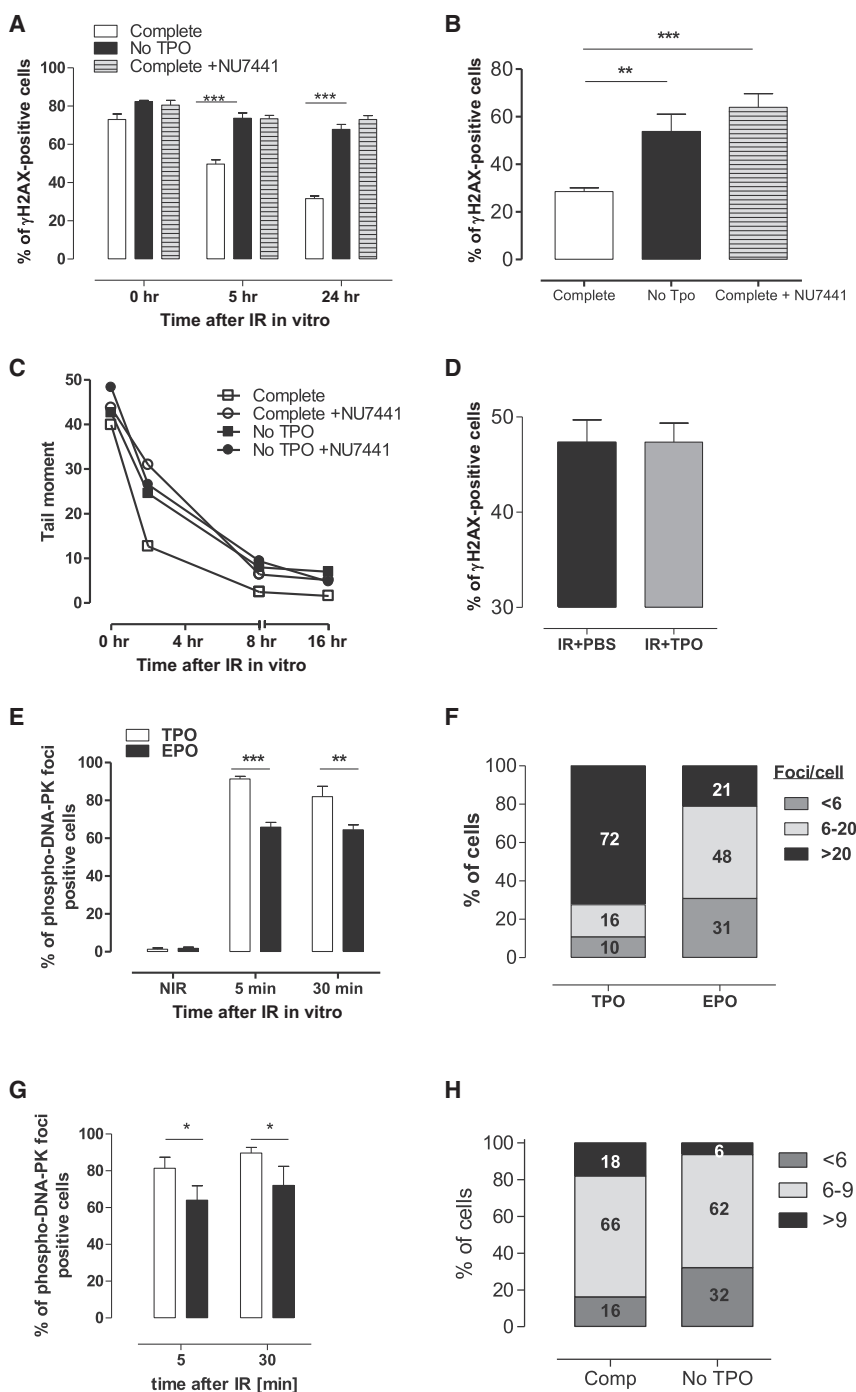


Figure 4. TPO Regulates a DNA-PK-Dependent Pathway

(A and B) Percentages of γ H2AX-positive cells in LSK (A) or in LSK-CD34⁺ (B) cells cultured in the presence or absence of 10 μ M NU7441 and irradiated (2 Gy) in vitro. Means + SEM of three separate experiments with four to six mice are shown.

(C) Comet assays in Lin⁺ cells from mice as in (A) and (B). Representative experiment out of three similar experiments performed with cells pooled from three to four mice is shown.

(D) Percentage of γ H2AX-positive LSK cells from SCID mice treated with PBS or TPO and TBI 16 hr before. Means + SEM, n = 4.

(E–H) pSer2056-DNA-PK foci in UT7-Mpl (E and F) or human CD34⁺ (G) and CD34⁺CD38⁺ (H) HSPCs cultured in medium containing TPO or not and IR (2 Gy). (E and G) Means + SEM of the percentage of cells with more than six foci from three independent experiments. (F and H) Foci-number repartition per cell 30 min after IR. Representative experiments out of three performed. See also Figure S4.

pathways. The above data show that TPO regulates DNA damage in HSC-enriched, mostly quiescent LSK-CD34⁺ cells (65%–80% G0), HSPCs (LSK cells, 30%–40% G0), proliferating Lin⁺ progenitors and UT7-Mpl cells. This suggests that the mechanism involved is different from HR which acts only during the G2 and S phases. Supporting this hypothesis, TPO did not increase IR-induced Rad51 foci formation, an in vivo functional marker of HR (Figure S4A), and it could not improve repair of DSBs induced by replicative stresses such as camptotecin and hydroxyurea (data not shown).

NHEJ is the predominant repair mechanism for DSBs resulting from IR (Iliakis et al., 2004). Thus, we then tested this pathway by analyzing the involvement of its main enzyme, DNA-PK. Addition of the specific DNA-PK inhibitor NU7441 to TPO-containing cultures of both LSK and LSK-CD34⁺ cells abolished TPO-improved γ H2AX foci resolution to the level observed in the absence of TPO (Figures 4A and 4B). Similarly, NU7441

Thus, TPO-mediated decrease in DNA damage in HSPCs and HSCs is unrelated to their cell-cycle status and is not due to changes in quiescence, proliferation, or apoptosis in vivo and in vitro. Rather, this effect seems to result specifically from an alteration in the DNA repair process.

TPO Regulates a DNA-PK-Dependent NHEJ Pathway

We next examined the mechanism involved in TPO-mediated DSB repair. HR and NHEJ are the two major DSB repair

inhibited the fast rejoining of DSBs induced by TPO, as measured by neutral comet assays (Figure 4C). Interestingly, in the absence of TPO a slow repair process occurred on which NU7441 had no effect, showing that this repair process takes place in a DNA-PK-independent manner. Confirming the importance of DNA-PK activation in TPO-mediated DNA repair, TPO injection to severe combined immunodeficiency (SCID) mice, which are NHEJ repair deficient as a result of a *DNA-PKcs* mutation, did not decrease TBI-induced LSK γ H2AX foci

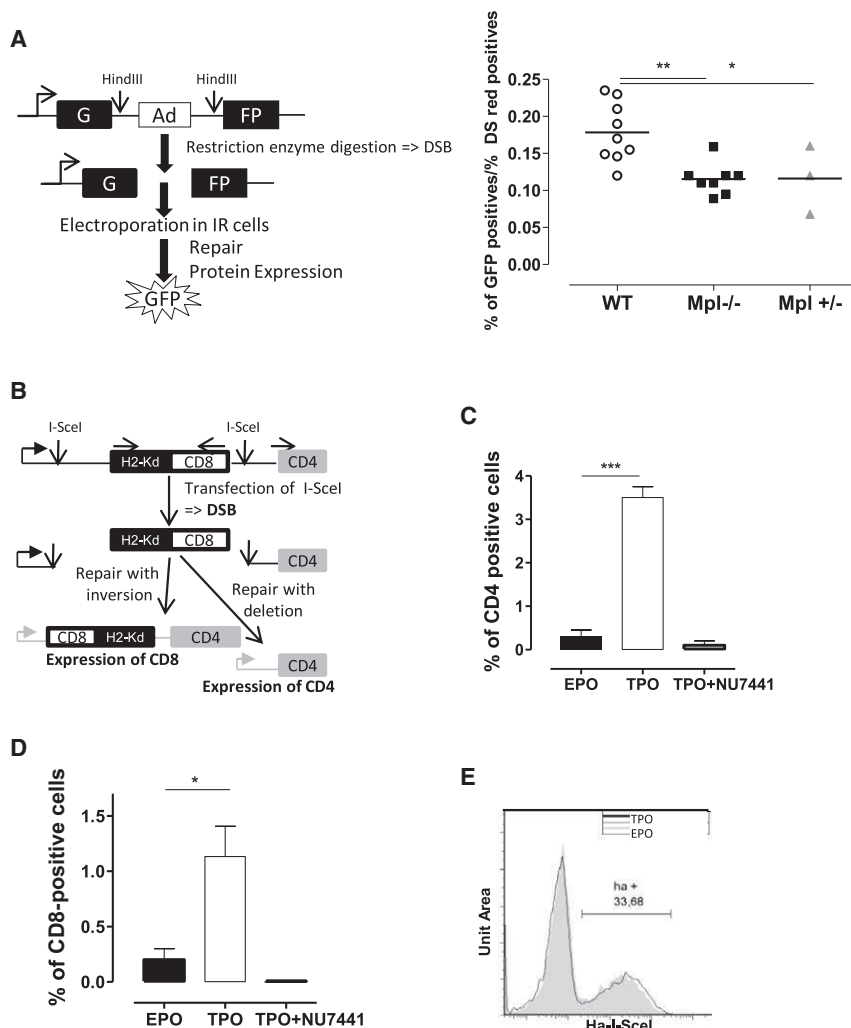


Figure 5. TPO Increases NHEJ Repair Efficiency

(A) Quantification of NHEJ activity in WT, *Mpl*^{-/-}, or *Mpl*^{+/-} Lin⁻Kit⁺ cells, expressed as the ratio of double-positive GFP⁺DsRed⁺ cells to total DsRed cells (n = 8).

(B) The NHEJ substrate stably incorporated in UT7-Mpl cells.

(C and D) Frequencies of inversion (C, CD8⁺) or deletion (D, CD4⁺) events in the presence or absence of TPO or NU7441, 72 hr after I-SceI electroporation. A representative experiment showing means \pm SEM of events obtained from three independent clones.

(E) Representative experiment of I-SceI expression 72 hr after electroporation in EPO or TPO.

NHEJ activity more thoroughly, we used an intrachromosomal substrate (Figure 5B) stably introduced in UT7-Mpl cells and introduced DSBs using the meganuclease HA-I-SceI (Guirouilh-Barbat et al., 2004). NHEJ events scored by CD4 or CD8 expression were greatly enhanced in cells treated with TPO (Figures 5C and 5D), whereas I-SceI expression was similar in both conditions (Figure 5E). As a control, NU7441 completely abrogated NHEJ activity. Taken together, these results show that TPO stimulates DNA-PK activity and NHEJ-mediated DNA repair.

TPO Confers Genomic Stability in Response to DNA Damage

Defects in DNA-PK-dependent NHEJ repair lead to a dramatic increase in large deletions and translocations (Ferguson

et al., 2000; Weinstock et al., 2007). This suggests that the loss of TPO signal may lead to enhanced generation of misrepaired HSPCs. Indeed, cells derived from IR-exposed *Mpl*^{-/-} LSK cells showed significantly higher chromosomal aberrations than WT controls (Figure 6A). Spectral karyotyping analysis using fluorescence in situ hybridization (FISH) probes specific for chromosomes 2, 6, and 12 showed that BM cells isolated from *Mpl*^{-/-} mice 24 hr post-TBI displayed three times more chromosomal translocations than those from WT mice (Figure 6B). No significant difference was found between WT and *Mpl*^{-/-} mice in the absence of IR (Figures 6B and 6C).

Lin⁻ progenitors isolated from WT mice 5 months post-TBI showed increased genomic instability compared to their nonirradiated age-matched counterparts, and this was further accentuated in cells from *Mpl*^{-/-} mice (Figure 6C). This confirms the increased genomic instability in *Mpl*^{-/-} cells and shows that a greater number of *Mpl*^{-/-} cells expressing more aberrations could persist for several months in vivo.

As *Mpl*^{-/-}, WT HSPCs irradiated in vitro and cultured in the absence of TPO harbored high numbers of chromosomal rearrangements (Figure 6A), showing that TPO-increased NHEJ

et al., 2000; Weinstock et al., 2007). This suggests that the loss of TPO signal may lead to enhanced generation of misrepaired HSPCs. Indeed, cells derived from IR-exposed *Mpl*^{-/-} LSK cells showed significantly higher chromosomal aberrations than WT controls (Figure 6A). Spectral karyotyping analysis using fluorescence in situ hybridization (FISH) probes specific for chromosomes 2, 6, and 12 showed that BM cells isolated from *Mpl*^{-/-} mice 24 hr post-TBI displayed three times more chromosomal translocations than those from WT mice (Figure 6B). No significant difference was found between WT and *Mpl*^{-/-} mice in the absence of IR (Figures 6B and 6C).

Lin⁻ progenitors isolated from WT mice 5 months post-TBI showed increased genomic instability compared to their nonirradiated age-matched counterparts, and this was further accentuated in cells from *Mpl*^{-/-} mice (Figure 6C). This confirms the increased genomic instability in *Mpl*^{-/-} cells and shows that a greater number of *Mpl*^{-/-} cells expressing more aberrations could persist for several months in vivo.

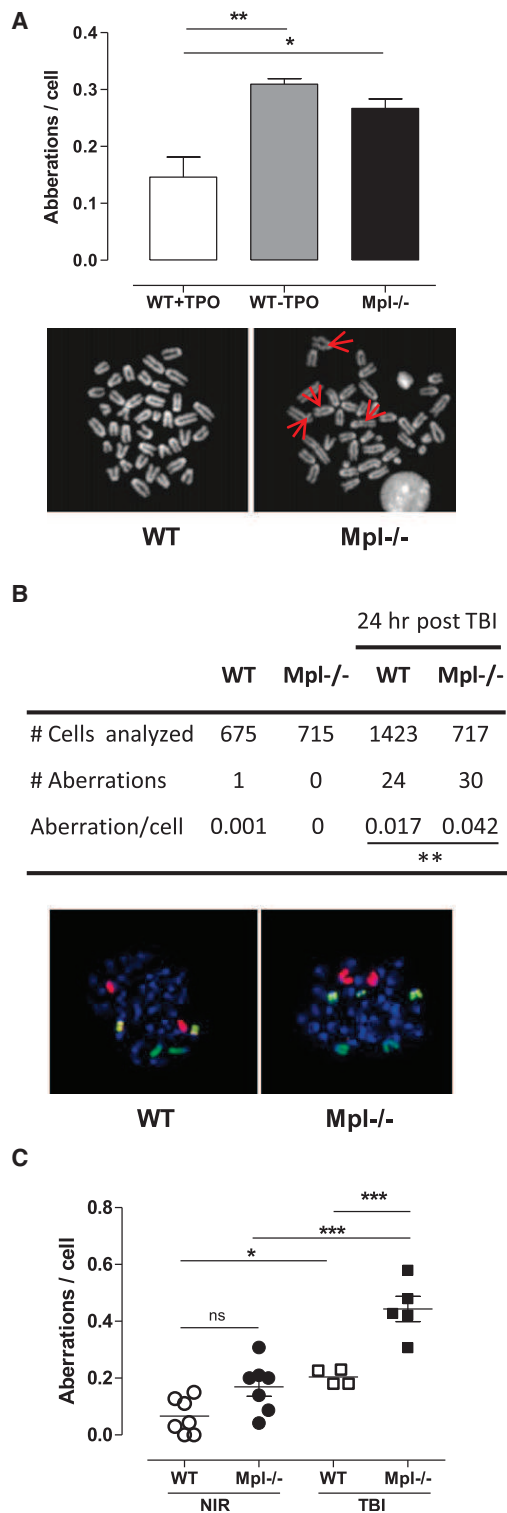


Figure 6. Increased Genomic Instability in *Mpl*^{-/-} HSPCs in Response to DNA Damage

(A) Chromosomal aberrations in metaphases prepared from WT and *Mpl*^{-/-} LSK cells exposed to IR (2 Gy) in vitro and cultured in complete medium or without TPO for 48 hr. Top: Means + SEM of aberrations per cell from three independent experiments with three WT or *Mpl*^{-/-} mice. At least 50 complete

could prevent IR-mediated genomic instability in HSPC descendants. We next examined whether TPO-induced DSB repair at early times after IR could lead to long-term protection in vivo. Thus, WT CD45.1 LSK cells cultured in the presence or absence of TPO for short times before and after exposition to IR in vitro (Figure S5A) were injected into lethally irradiated congenic CD45.2 mice. Metaphase analysis of donor progenitor progeny 4 months posttransplantation showed that exposure to TPO led to decreased genomic aberrations (Figure S5B).

To determine whether TPO could improve long-term adverse effects of IR in vivo, mice were treated with TPO or PBS prior to TBI and analyzed 3 months later (Figure 7A, stage 1). It has been reported that despite seeming recovery of phenotypically defined HSC number and cell cycle, DNA damage may persist and HSC function remains altered several months after IR (Marusyk et al., 2009; Simonnet et al., 2009). Accordingly, both LSK and LSK-CD34⁺ cells isolated from TBI mice harbored more γ H2AX foci than cells from nontreated mice (Figures 7B and 7C), whereas their frequencies and proliferation and quiescence statuses at that time were not significantly different (Figures S5D–S5G). Injection of TPO or Romiplostim almost completely abolished persistent DNA damage in HSCs and HSPCs but had no effect on their number and cycle. In addition, the in vitro LSK clonogenic potential was similar among the three groups of mice (data not shown). Thus, TPO did not reduce the numbers of γ H2AX-positive LSK cells by inhibiting senescence (Wang et al., 2006) or inducing proliferation. Three months after TBI, metaphases from progenitor cells isolated from TPO-injected mice also displayed greatly reduced chromosomal aberrations (Figure 7D). This shows that TPO injection before TBI limits IR-induced long-lasting DNA damage and genomic instability in HSC/HSPCs.

Previous studies have shown that sublethal IR induces intense HSC cycling to reconstitute hematopoiesis following acute ablation of differentiated leukocytes (Ban and Kai, 2009; Marusyk et al., 2009; Michalak et al., 2010). Because designation of HSCs requires contribution to hematopoiesis for at least 3 months, the results above suggest that the progenitors isolated 5 months (Figure 6C) or 12 weeks (Figure 7D) after IR may represent HSC progeny and that TPO might restrain genomic instability in these cells. However, to distinguish this hypothesis from a bystander effect (Lorimore et al., 2005) and determine whether the reduced DNA damage in cells from TPO-treated mice represents HSCs capable of long-term hematopoietic reconstitution, LSK cells from stage 1 (Figure 7A) were used to reconstitute lethally irradiated CD45.2 recipients. Four months after reconstitution (Figure 7A, stage 2), the progenitor progeny of LSK cells from the group that had received TBI and PBS displayed significantly increased levels of genomic rearrangements compared to their nonirradiated counterparts or those treated

metaphases were scored. Bottom: representative images with aberrations indicated by arrows.

(B) Summary table and representative pictures of chromosomal translocations measured by three-color FISH in WT and *Mpl*^{-/-} BM cell metaphases 24 hr after TBI.

(C) Chromosomal aberrations analyzed as in (A) in WT and *Mpl*^{-/-} Lin⁺ progenitors 5 months after TBI or in NIR age-matched controls. Each point represents an individual mouse. Means \pm SEM.

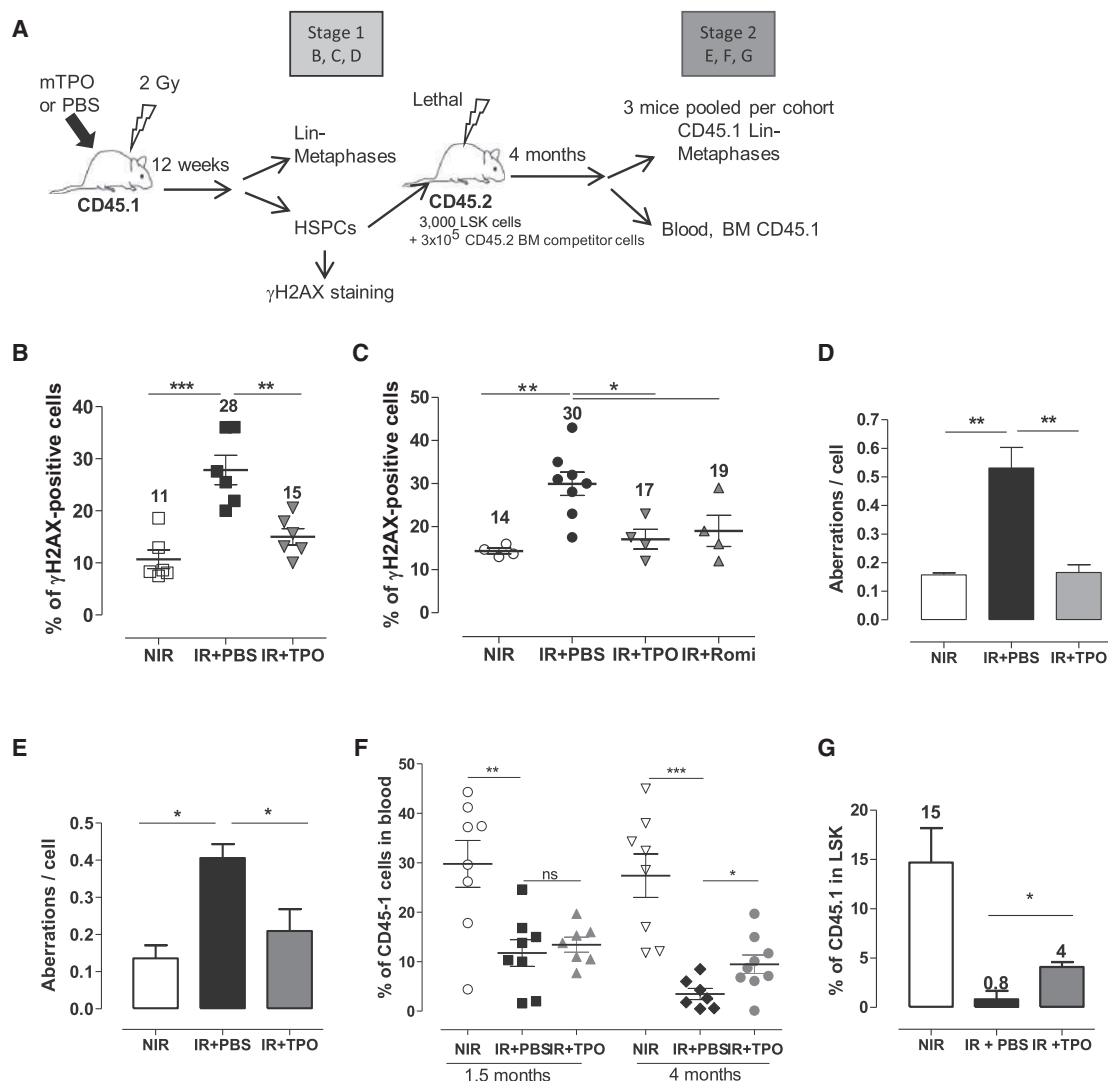


Figure 7. TPO Confers Long-Term Protection and Genomic Stability to HSCs in Response to IR

(A) Experimental design to test TPO and TBI effects on genomic instability and long-term reconstitution in vivo.

(B and C) Frequencies of γ H2AX-positive LSK (B) and LSK-CD34⁺ (C) cells at stage 1 from mice that received PBS, TPO, or Romiplostim (Romi) before TBI. Each dot represents an individual mouse. Means \pm SEM are shown with the values above the dots indicating mean numbers.

(D) Frequencies of chromosomal aberrations in stage 1-Lin⁺ progenitors, detected by DAPI staining ($n = 3$ mice for each group).

(E–G) Analysis at stage 2. (E) Frequencies of chromosomal aberrations in CD45.1⁺Lin⁺ progenitor metaphases measured as in (D). Means \pm SEM of three independent pools containing three mice per group are shown. (F and G) CD45.1 chimerism in peripheral blood (F) and in BM LSK cells 4 months post-transplantation (G). Means \pm SEM are shown ($n = 7$ –9 mice per group). See also Figure S5.

with TPO before TBI (Figure 7E). These results support previous data showing that IR induces genomic instability in HSCs that can be transmitted to their progeny (Mohrin et al., 2010). They also indicate that TPO injection before TBI significantly reduced this effect.

Increased DNA damage is linked to HSC dysfunction (Nijnik et al., 2007; Rossi et al., 2007). We therefore assessed whether TPO could also improve the reconstitution capacity of irradiated cells. Supporting this possibility, the long-term engraftment of LSK cells exposed to TPO before and after IR in vitro was enhanced by almost 2-fold as compared to cells not treated with TPO (Figure S5C). Competitive transplant experiments

(Figure 7A, stage 2) showed that LSK cells isolated from mice that had received PBS and TBI 3 months before were far less efficient than those from nonexposed mice in outcompeting recipient cells, with a mean 9-fold decrease in the level of donor contribution to peripheral blood leukocytes 4 months after transplantation (Figure 7F). TPO injection partially restored this defect with a 3- to 5-fold increase in donor CD45.1 chimerism in the peripheral blood and in BM LSK cells (Figures 7F and 7G), although this level remained decreased compared to results in mice reconstituted with LSK cells from nonirradiated donors. No difference was found between the TPO and PBS groups at 6 weeks posttransplantation (Figure 7E), suggesting that TPO

treatment improved HSC function of irradiated cells rather than their short-term proliferation.

Altogether, these results show that the presence of TPO *in vitro* or its injection *in vivo* just before IR reduced IR-induced HSPC mutagenesis and loss function.

DISCUSSION

Management of acute myelosuppression following radiotherapy has been significantly improved in recent years by the use of growth factors. TPO injection shortly after IR has been shown to accelerate progenitor recovery and prevent short-term pancytopenia (Hérodin et al., 2003; Neelis et al., 1998; Shibuya et al., 1998) by inhibiting acute p53-dependent apoptosis (Pestina et al., 2001). However, how TPO affects the HSC response to DNA-damaging agents has never been studied. In addition, protection from immediate IR-induced ablation does not always correlate with maintenance of long-term proliferative capacities (Marusyk et al., 2009). Much remains to be elucidated regarding how cytokines and environmental signals integrate the DNA damage responses in HSCs and regulate their long-term defects following radiotherapy. In this study we uncover a specific function for TPO-Mpl in the regulation of DNA-PK-dependent NHEJ activity that ensures efficient DNA repair and chromosomal integrity of HSPCs and limits their residual injury in response to IR or topoisomerase-II inhibitors. This is the first demonstration that a cytokine involved in HSCs' maintenance may also regulate their response to external DNA-damaging insults by controlling the DSB repair machinery. A single injection of TPO prior to TBI was sufficient to significantly improve DNA damage repair, suggesting that endogenous HSCs in the BM niche respond more similarly to DSB inducers and TPO signaling than isolated HSCs *ex vivo*.

Recent data have shown that NHEJ activity is higher in quiescent HSCs than in proliferating HPCs (Mohrin et al., 2010). Although our results do not call this into question, increased HR does not seem to be the mechanism by which TPO favors DSB repair. Indeed, TPO increases DSB repair similarly in myeloid progenitors (Lin[−]Kit⁺), mouse and human HSPC- and HSC-enriched cell populations, and UT7-Mpl cells containing various proportions of quiescent cells, without modifying their cell cycle upon IR *in vivo* and *in vitro*. Moreover, we could not observe a difference in Rad51 foci formation in LSK cells treated with TPO or not, or in *Mpl*^{−/−} cells (data not shown). Rather, our results indicate that TPO increases DNA repair in these different cell types by modulating the efficiency of the NHEJ pathway. This is shown by (1) the complete inhibition of TPO-promoted γ H2AX resolution and DSB rejoining in both LSK and LSK-CD34[−] cells by a specific inhibitor of DNA-PK; (2) the loss of the TPO effect *in vivo* in DNA-PKcs-deficient SCID mice; (3) the increased NHEJ efficiency in irradiated myeloid progenitors and in UT7-Mpl upon TPO treatment; and (4) the increased IR-induced DNA-PK phosphorylation at Ser2056 and Thr2609 in the presence of TPO. A Ser to Ala mutation at both sites has been shown to compromise both radiation resistance and NHEJ (Chan et al., 2002; Chen et al., 2005), suggesting that TPO may be required for full DNA-PK activity. Additional studies are required for determining how TPO signaling increases DNA-PK phosphorylation. However, whatever the mechanism,

the TPO effect on DNA-PK translates into a major effect on NHEJ activity, as shown by the extent of decrease in NHEJ efficiency in the absence of TPO. This fits with reports showing that a partial defect in DNA-PK expression or phosphorylation may be sufficient to underlie DSB repair defects and radiosensitive phenotypes (Burma et al., 2006; Chan et al., 2002; Chen et al., 2005).

In contrast to HR, NHEJ is intrinsically error prone. However, if chromosomal integrity is the endpoint, it can be considered as a conservative error-free process accommodating non-fully complementary ends at the cost of limited mutagenesis. Indeed, in the absence of major classic NHEJ actors, cells use a slower backup DNA-PK-independent NHEJ pathway that has been shown to be the primary mediator of IR-induced genome rearrangements (Iliakis et al., 2004; Martín et al., 2005). The genomic instability and the significant increase in chromosomal translocations observed in the *in vivo* *Mpl*^{−/−} HSPC progeny or in cells irradiated in the absence of TPO suggest that TPO-Mpl signaling may favor DSB shunting in rapid classic DNA-PK-dependent NHEJ repair. In agreement with this possibility, neutral comet assays show that the DSB repair occurring in the absence of TPO is slow, with 20%–30% of breaks still unrepaired 8–16 hr after IR. Furthermore, this slow DNA repair is DNA-PK independent given that it could not be inhibited by NU7441. HSCs, which cannot use HR because of their quiescent status, are more vulnerable than progenitors to the acquisition of IR-induced genome rearrangements (Mohrin et al., 2010). However, our data suggest that environmental BM signals can act to limit this phenomenon by increasing the global efficiency of NHEJ-mediated repair through its fast DNA-PK-dependent component. Interestingly, expression of the main DNA-PK-dependent classic NHEJ proteins Ku80 and DNA-Ligase IV has been shown to be downregulated by Flt3-ITD and Bcr-Abl oncogenes (Fan et al., 2010). Recent data have shown that leukemic stem cells can arise not only from HSCs but also from committed primitive progenitors (Passegué and Weisman, 2005). TPO was found to regulate DNA-PK-dependent DSB repair in both myeloid progenitors and HSC-enriched cells, and this pathway is downregulated in *Mpl*^{+/−} and *Mpl*^{−/−} cells. This suggests that the loss or reduced expression of Mpl could lead to hematopoietic malignancies and a tumor-suppressor role for this receptor in response to IR. This possibility is in agreement with the increased propensity of CAMT patients to develop AML (Maserati et al., 2008). Interestingly, increased sensitivity to preconditioning treatments and the presence of chromosomal aberrations resembling that found in therapy-induced MDS and AML have been described for those patients (Maserati et al., 2008; Steele et al., 2005). We could not observe malignancies in *Mpl*^{−/−} mice sacrificed 5 months after TBI. This might be due to the long latency for IR-induced leukemia development in mice and the resistance to C57Bl/6 strain to AML and MDS. Thus, additional studies are required for validation of this hypothesis.

Full *Mpl* expression is required for TPO-mediated DNA repair. This requirement for high TPO signaling may explain why an acute injection of TPO to TPO-proficient mice can increase DNA repair. However, the loss of DSB repair function of *Mpl*^{+/−} cells is intriguing given that these mice, in contrast with *Mpl*^{−/−} mice (Kimura et al., 1998; Qian et al., 2007), have normal

numbers of progenitors (Alexander et al., 1996) and HSCs and also have reconstitution ability (B.d.L., L.P.-C., M.S., and F. Porteu, unpublished data). Thus, Mpl is haplosufficient for HSC maintenance and expansion posttransplantation but not for DNA damage response to IR, suggesting that these functions are separately controlled. In agreement with this possibility, the critical role of TPO in adult HSC maintenance has been shown to primarily reflect its ability to regulate HSC quiescence (Qian et al., 2007; Yoshihara et al., 2007), whereas the TPO-induced DNA repair reported here and HSC radiosensitivity (Mohrin et al., 2010) are independent of their quiescence.

Mice or humans exposed to moderate or high doses of IR exhibit residual defects in HSC function even after hematopoiesis has recovered months after exposure (Marusyk et al., 2009; Simonnet et al., 2009; Wang et al., 2006). In addition, IR increases the probability of the occurrence of oncogenic mutations. A recent report has demonstrated that HSPCs forced to proliferate before IR exposure through the application of an in vivo mobilization treatment to mice with granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) and cyclophosphamide have significantly decreased mutation rates because of enhanced DNA-repair fidelity in conjunction with the preservation of their relative radioresistance in vitro (Mohrin et al., 2010). However, G-CSF injection has also been shown to promote HSPC proliferation and differentiation at the expense of HSC self-renewal (van Os et al., 2000), inducing a differentiation checkpoint in the context of DNA damage (Wang et al., 2012). Abrogation of this checkpoint prolongs HSC self-renewal but results in DNA-damage accumulation. Thus, the routine use of G-CSF to hasten recovery from radiotherapy or chemotherapy-induced neutropenia may decrease HSCs' mutagenesis but impair their function. Our results show that short-term specific exposure to TPO in vitro or in vivo protects HSCs from IR-induced genomic instability and rescues, at least partially, their loss of activity. TPO also increases the repair of DSBs induced by etoposide and DXR. Romiplostim was found to recapitulate TPO effects on both short-term and long-term TBI-induced accumulation of DNA damage in HSCs. Thus, our results may have important clinical implications in opening new avenues for the use of TPO agonists prior to therapy with DNA-damaging agents to minimize the risk of secondary AML and long-term residual HSPC injury. Importantly, although we have not tried to optimize the dose of TPO used, a single injection just before exposure to IR proved sufficient to induce some long-term protection against DNA damage. This may avoid the described adverse complications induced by prolonged, but not by acute, treatments with TPO or its agonists (Ikeda and Miyakawa, 2009; Léon et al., 2012).

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Mice, Cell Culture, and Reconstitution Assays

Mpl^{-/-} backcrossed on C57BL/6 (CD45.2) background (kindly provided by Dr F. de Sauvage) and 129S2/Sv *Kit*^{W^v/Kit}^{W^v-v} mice were described previously (Petit-Cocault et al., 2007; Allix et al., 2008). C57BL/6J (CD45.2 and CD45.1) and CB17-*Prkdc*-scid mice were purchased from Charles River and Harlan laboratories, respectively. Unless otherwise specified, mice of 8–10 weeks of age were used. All procedures were approved by the Animal Care Committee (registered no. P2.MG.137.10, 2010) and the department director of veterinary services of Paris (agreement no. 75-1064). Lin⁻, LSK, and LSK-CD34⁻ cells were isolated from BM and stained as described (Saulnier

et al., 2012). The cells were cultured in StemSpan serum-free expansion medium (SFEM, STEMCELL Technologies) supplemented with recombinant Flt3 ligand (100 ng/ml), interleukin-3 (IL-3, 10 ng/ml), IL-6 (10 ng/ml), SCF (100 ng/ml), and TPO (50 ng/ml), all from PeproTech (Rocky Hill, NJ, USA), (complete medium) or in the same medium without TPO. CD34⁺ and CD34⁺CD38⁻ human HSPCs were isolated from cord blood or cytopheresis, as described (Hamelin et al., 2006). UT7-Mpl cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS) and 2 U/ml EPO (Boehringer Ingelheim). Cell IR in vitro was carried out in a BIOBEAM 8000 irradiator (Gamma-Service Medical GmbH, Leipzig, Germany). Mouse TBI was performed in an IBL 637 cesium irradiator (Curie Institute, Paris). For competitive reconstitution experiments, 3,000 LSK cells sorted from C57BL/6 CD45.1 mice subjected to TBI (2 Gy) or not as well as TPO injection (8 μ g/kg body weight) were injected in lethally irradiated (10 Gy) C57BL/6 CD45.2 congenic mice, together with 3×10^5 BM CD45.2 competitor cells, and analyzed 4 months later.

Immunofluorescence

Immunofluorescence was performed as described (Pawlikowska et al., 2010), with cells cytospun on glass slides. Slides were visualized with a Leica DMI 6000 microscope (Wetzlar, Germany) equipped with a 63 \times 1.6 oil-immersion objective and a Micromax charge-coupled device camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA). Pictures were analyzed using ImageJ software.

Comet and Cytogenetic Assays

The neutral comet assay and chromosomal-aberration analysis in metaphase spreads were performed as described (Pawlikowska et al., 2010). Three-color FISH was performed using whole-chromosome probes for mouse chromosomes 2 (fluorescein isothiocyanate [FITC]), 6 (Texas red), and 12 (FITC:Texas red) (MetaSystems, Altussheim, Germany), and counterstaining was performed with DAPI-Antifade solution (Qbiogene, Illkirch, France), as reported (Pouzoulet et al., 2007). Fluorescence was analyzed with a Zeiss Axioplan epifluorescent microscope and Isis-multicolor FISH (mFISH) imaging system (MetaSystems).

Cell-Cycle Analysis

Cell cycle was analyzed by staining Lin⁻ cells with Hoechst and Pyronin Y and with anti-CD34, Sca1, and c-Kit (Saulnier et al., 2012). Analysis was performed using an LSRII flow cytometer (BD Biosciences) and FlowJo software (TreeStar).

NHEJ Assays

UT7-Mpl cells were electroporated with the NHEJ pCOH substrate (Guirouilh-Barbat et al., 2004), and clonal populations were selected in the presence of blasticidin (40 μ g/ml). Expression of the meganuclease I-SceI was achieved by electroporation of pcDNA-HA-I-SceI, using Amaxa Kit V (Lonza, Amaxa, Basel). The cells were then cultured in medium containing 2 U/ml EPO or 3 nM TPO peptide (Hamelin et al., 2006). End-joining was analyzed 48 hr to 1 week later. For assessing I-SceI expression, the cells were permeabilized by treatment with 0.1% Triton X-100 (10 min, room temperature [RT]) and methanol (50%, 10 min, 4°C) and stained with anti-hemagglutinin (HA) followed by anti-mouse-FITC antibodies.

For testing NHEJ activity on primary cells, WT and *Mpl*^{-/-} Lin⁻Kit⁺ cells were cultured in StemSpan SFEM containing 25 ng/ml SCF, 25 ng/ml IL-11, 10 ng/ml IL-3, 50 ng/ml TPO, and 10 ng/ml granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). After 24 hr, cells were irradiated and electroporated with 1.5 μ g of HindIII-digested pEGFP-Pem1-Ad2 plasmid (Seluanov et al., 2004) and 0.5 μ g of pDsRed-Express (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) using Amaxa Kit V. Cells were analyzed by flow cytometry 24 hr later.

Statistical Analysis

Results were evaluated using either one-way ANOVA and Tukey comparison test or unpaired t test by GraphPad Prism version 5.0 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). For FISH analysis, a specific chi-square test adapted to Poisson statistics was used (Pouzoulet et al., 2007). Results are shown as means and SEM and the value of **p* < 0.05 was determined as significant, and ***p* < 0.01 or ****p* < 0.001 as highly significant.

SUPPLEMENTAL INFORMATION

Supplemental Information includes five figures and Supplemental Experimental Procedures and can be found with this article online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2012.10.012>.

ACKNOWLEDGMENTS

We thank R. Dyunga for technical assistance; the Cochin Animal Facility; B. Durel of the Cochin Imaging Facility for microscopy analysis; D. Clay (Hospital Paul Brousse, Villejuif, France) and the Immunobiology Platform of the Cochin Institute for cell-sorting assistance; Drs. P. Bertrand (UMR CNRS 217, CEA, Fontenay aux Roses, France) and V. Gorbunova (University of Rochester, NY, USA) for the gifts of the pCOH NHEJ substrate, pcDNA-HA-I-SceI, and pEGFP-Pem1-Ad2 constructs, respectively; and Dr. P. Sujobert for helpful discussions. This work was supported by INSERM and by grants from Agence Nationale pour la Recherche (ANR-08-BLAN-0332) and Ligue Contre le Cancer (RS12/75-67). P.P. is a recipient of fellowships from DIM STEM-Pôle. B.d.L. received fellowships from the Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche and from the Fondation ARC.

Received: June 20, 2012

Revised: September 14, 2012

Accepted: October 20, 2012

Published: December 13, 2012

REFERENCES

- Alexander, W.S., Roberts, A.W., Nicola, N.A., Li, R., and Metcalf, D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 87, 2162–2170.
- Allix, S., Reyes-Gomez, E., Aubin-Houzelstein, G., Noël, D., Tirt, L., Panthier, J.J., and Bernex, F. (2008). Uterine contractions depend on KIT-positive interstitial cells in the mouse: genetic and pharmacological evidence. *Biol. Reprod.* 79, 510–517.
- Ban, N., and Kai, M. (2009). Implication of replicative stress-related stem cell ageing in radiation-induced murine leukaemia. *Br. J. Cancer* 101, 363–371.
- Burma, S., Chen, B.P., and Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst.)* 5, 1042–1048.
- Chan, D.W., Chen, B.P., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 16, 2333–2338.
- Chen, B.P., Chan, D.W., Kobayashi, J., Burma, S., Asaithamby, A., Morotomi-Yano, K., Botvinick, E., Qin, J., and Chen, D.J. (2005). Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J. Biol. Chem.* 280, 14709–14715.
- Fan, J., Li, L., Small, D., and Rassool, F. (2010). Cells expressing FLT3/ITD mutations exhibit elevated repair errors generated through alternative NHEJ pathways: implications for genomic instability and therapy. *Blood* 116, 5298–5305.
- Ferguson, D.O., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Frank, K.M., Gao, Y., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 6630–6633.
- Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T., and Kaushansky, K. (2002). Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J. Clin. Invest.* 110, 389–394.
- Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* 14, 611–623.
- Hamelin, V., Letourneux, C., Romeo, P.H., Porteu, F., and Gaudry, M. (2006). Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood* 107, 3106–3113.
- Hérodin, F., Bourin, P., Mayol, J.F., Lataillade, J.J., and Drouet, M. (2003). Short-term injection of antiapoptotic cytokine combinations soon after lethal gamma irradiation promotes survival. *Blood* 101, 2609–2616.
- Ikeda, Y., and Miyakawa, Y. (2009). Development of thrombopoietin receptor agonists for clinical use. *J. Thromb. Haemost.* 7 (Suppl 1), 239–244.
- Iliakis, G., Wang, H., Perrault, A.R., Boecker, W., Rosidi, B., Windhofer, F., Wu, W., Guan, J., Terzoudi, G., and Pantelias, G. (2004). Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet. Genome Res.* 104, 14–20.
- Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997–1002.
- Kimura, S., Roberts, A.W., Metcalf, D., and Alexander, W.S. (1998). Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 1195–1200.
- Léon, C., Evert, K., Dombrowski, F., Pertuy, F., Eckly, A., Laeuffer, P., Gachet, C., and Greinacher, A. (2012). Romiplostim administration shows reduced megakaryocyte response-capacity and increased myelofibrosis in a mouse model of MYH9-RD. *Blood* 119, 3333–3341.
- Lorimore, S.A., McIlrath, J.M., Coates, P.J., and Wright, E.G. (2005). Chromosomal instability in unirradiated hemopoietic cells resulting from a delayed in vivo bystander effect of gamma radiation. *Cancer Res.* 65, 5668–5673.
- Martín, M., Genescà, A., Latre, L., Jaco, I., Taccioli, G.E., Egozcue, J., Blasco, M.A., Iliakis, G., and Tusell, L. (2005). Postreplicative joining of DNA double-strand breaks causes genomic instability in DNA-PKcs-deficient mouse embryonic fibroblasts. *Cancer Res.* 65, 10223–10232.
- Marusyk, A., Casás-Selves, M., Henry, C.J., Zaberezhnyy, V., Klawitter, J., Christians, U., and DeGregori, J. (2009). Irradiation alters selection for oncogenic mutations in hematopoietic progenitors. *Cancer Res.* 69, 7262–7269.
- Maserati, E., Panarello, C., Morerio, C., Valli, R., Pressato, B., Patitucci, F., Tassano, E., Di Cesare-Merlone, A., Cugno, C., Balduini, C.L., et al. (2008). Clonal chromosome anomalies and propensity to myeloid malignancies in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (OMIM 604498). *Haematologica* 93, 1271–1273.
- Michalak, E.M., Vandenberg, C.J., Delbridge, A.R., Wu, L., Scott, C.L., Adams, J.M., and Strasser, A. (2010). Apoptosis-promoted tumorigenesis: gamma-irradiation-induced thymic lymphomagenesis requires Puma-driven leukocyte death. *Genes Dev.* 24, 1608–1613.
- Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7, 174–185.
- Neelis, K.J., Visser, T.P., Dimjati, W., Thomas, G.R., Fielder, P.J., Bloedow, D., Eaton, D.L., and Wagemaker, G. (1998). A single dose of thrombopoietin shortly after myelosuppressive total body irradiation prevents pancytopenia in mice by promoting short-term multilineage spleen-repopulating cells at the transient expense of bone marrow-repopulating cells. *Blood* 92, 1586–1597.
- Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., et al. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686–690.
- Pardanani, A.D., Levine, R.L., Lasho, T., Pikman, Y., Mesa, R.A., Wadleigh, M., Steensma, D.P., Elliott, M.A., Wolanskyj, A.P., Hogan, W.J., et al. (2006). MPLS15 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood* 108, 3472–3476.
- Passegué, E., and Weisman, I.L. (2005). Leukemic stem cells: where do they come from? *Stem Cell Rev.* 1, 181–188.
- Pawlikowska, P., Leray, I., de Laval, B., Guihard, S., Kumar, R., Rosselli, F., and Porteu, F. (2010). ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response. *Cell Death Differ.* 17, 1739–1750.

- Pestina, T.I., Cleveland, J.L., Yang, C., Zambetti, G.P., and Jackson, C.W. (2001). Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis. *Blood* 98, 2084–2090.
- Petit-Cocault, L., Volle-Challier, C., Fleury, M., Péault, B., and Souyri, M. (2007). Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis. *Development* 134, 3031–3040.
- Pouzoulet, F., Roch-Lefèvre, S., Giraudet, A.L., Vaurijoux, A., Voisin, P., Buard, V., Delbos, M., Bourhis, J., Voisin, P., and Roy, L. (2007). Monitoring translocations by M-FISH and three-color FISH painting techniques: a study of two radiotherapy patients. *J. Radiat. Res. (Tokyo)* 48, 425–434.
- Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Månsson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 671–684.
- Rossi, D.J., Bryder, D., Seita, J., Nussenzweig, A., Hoeijmakers, J., and Weissman, I.L. (2007). Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature* 447, 725–729.
- Saulnier, N., Guihard, S., Holy, X., Decembre, E., Jurdic, P., Clay, D., Feuillet, V., Pagès, G., Pouyssegur, J., Porteu, F., and Gaudry, M. (2012). ERK1 regulates the hematopoietic stem cell niches. *PLoS ONE* 7, e30788.
- Seluanov, A., Mittelman, D., Pereira-Smith, O.M., Wilson, J.H., and Gorbunova, V. (2004). DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101, 7624–7629.
- Shao, L., Sun, Y., Zhang, Z., Feng, W., Gao, Y., Cai, Z., Wang, Z.Z., Look, A.T., and Wu, W.S. (2010). Deletion of proapoptotic Puma selectively protects hematopoietic stem and progenitor cells against high-dose radiation. *Blood* 115, 4707–4714.
- Shibuya, K., Akahori, H., Takahashi, K., Tahara, E., Kato, T., and Miyazaki, H. (1998). Multilineage hematopoietic recovery by a single injection of pegylated recombinant human megakaryocyte growth and development factor in myelosuppressed mice. *Blood* 91, 37–45.
- Simonnet, A.J., Nehmé, J., Vaigot, P., Barroca, V., Leboulch, P., and Tronik-Le Roux, D. (2009). Phenotypic and functional changes induced in hematopoietic stem/progenitor cells after gamma-ray radiation exposure. *Stem Cells* 27, 1400–1409.
- Steele, M., Hitzler, J., Doyle, J.J., Germeshausen, M., Fernandez, C.V., Yuille, K., and Dror, Y. (2005). Reduced intensity hematopoietic stem-cell transplantation across human leukocyte antigen barriers in a patient with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and monosomy 7. *Pediatr. Blood Cancer* 45, 212–216.
- van Os, R., Robinson, S., Sheridan, T., and Mauch, P.M. (2000). Granulocyte-colony stimulating factor impedes recovery from damage caused by cytotoxic agents through increased differentiation at the expense of self-renewal. *Stem Cells* 18, 120–127.
- Wang, Y., Schulte, B.A., LaRue, A.C., Ogawa, M., and Zhou, D. (2006). Total body irradiation selectively induces murine hematopoietic stem cell senescence. *Blood* 107, 358–366.
- Wang, J., Sun, Q., Morita, Y., Jiang, H., Gross, A., Lechel, A., Hildner, K., Guachalla, L.M., Gompf, A., Hartmann, D., et al. (2012). A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell* 148, 1001–1014.
- Weinstock, D.M., Brunet, E., and Jasin, M. (2007). Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat. Cell Biol.* 9, 978–981.
- Wicke, D.C., Meyer, J., Buesche, G., Heckl, D., Kreipe, H., Li, Z., Welte, K.H., Ballmaier, M., Baum, C., and Modlich, U. (2010). Gene therapy of MPL deficiency: challenging balance between leukemia and pancytopenia. *Mol. Ther.* 18, 343–352.
- Xue, X., Pech, N.K., Shelley, W.C., Srour, E.F., Yoder, M.C., and Dinuer, M.C. (2010). Antibody targeting KIT as pretransplantation conditioning in immunocompetent mice. *Blood* 116, 5419–5422.
- Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoaka, S., Miyamoto, K., et al. (2007). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685–697.

Supplemental Information

Thrombopoietin-Increased DNA-PK-Dependent DNA

Repair Limits Hematopoietic Stem and Progenitor

Cell Mutagenesis in Response to DNA Damage

Bérengère de Laval, Patrycja Pawlikowska, Laurence Petit-Cocault, Chrystèle Bilhou-Nabera, Geneviève Aubin-Houzelstein, Michèle Souyri, Frédéric Pouzoulet, Murielle Gaudry, and Françoise Porteu

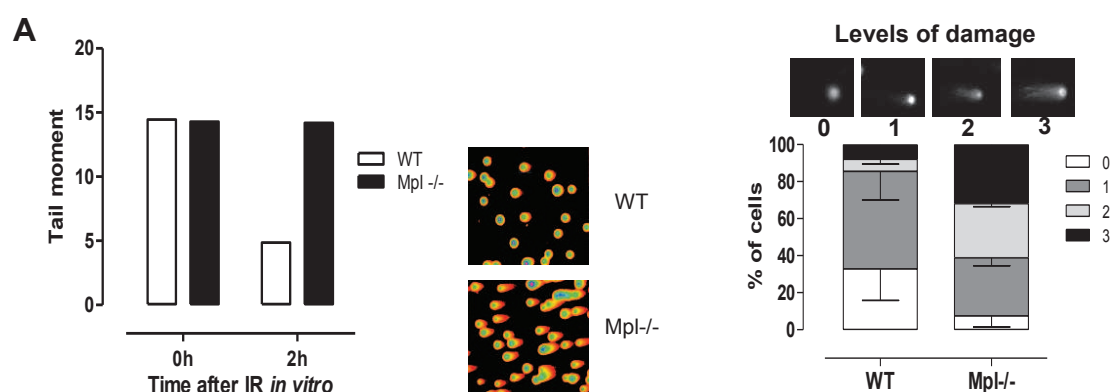


Figure S1. DSB Repair Deficiency in *Mpl*^{-/-} HPCs Assessed by Comet Assays, Related to Figure 1

WT or *Mpl*^{-/-} Lin⁻ cells were harvested directly (0) or after 2h of recovery from IR. (A) Representative picture and mean comet tail moment (250-350 cells counted). A representative experiment out of 3 similar ones performed on pools of 3-5 mice is shown. (B) DNA damage scoring. Top: representative examples of comet tail used for DNA content scoring. Bottom: quantification of cells in each DNA damage scoring category. Means and SEM of 3 independent experiments performed on pools of 3-5 mice

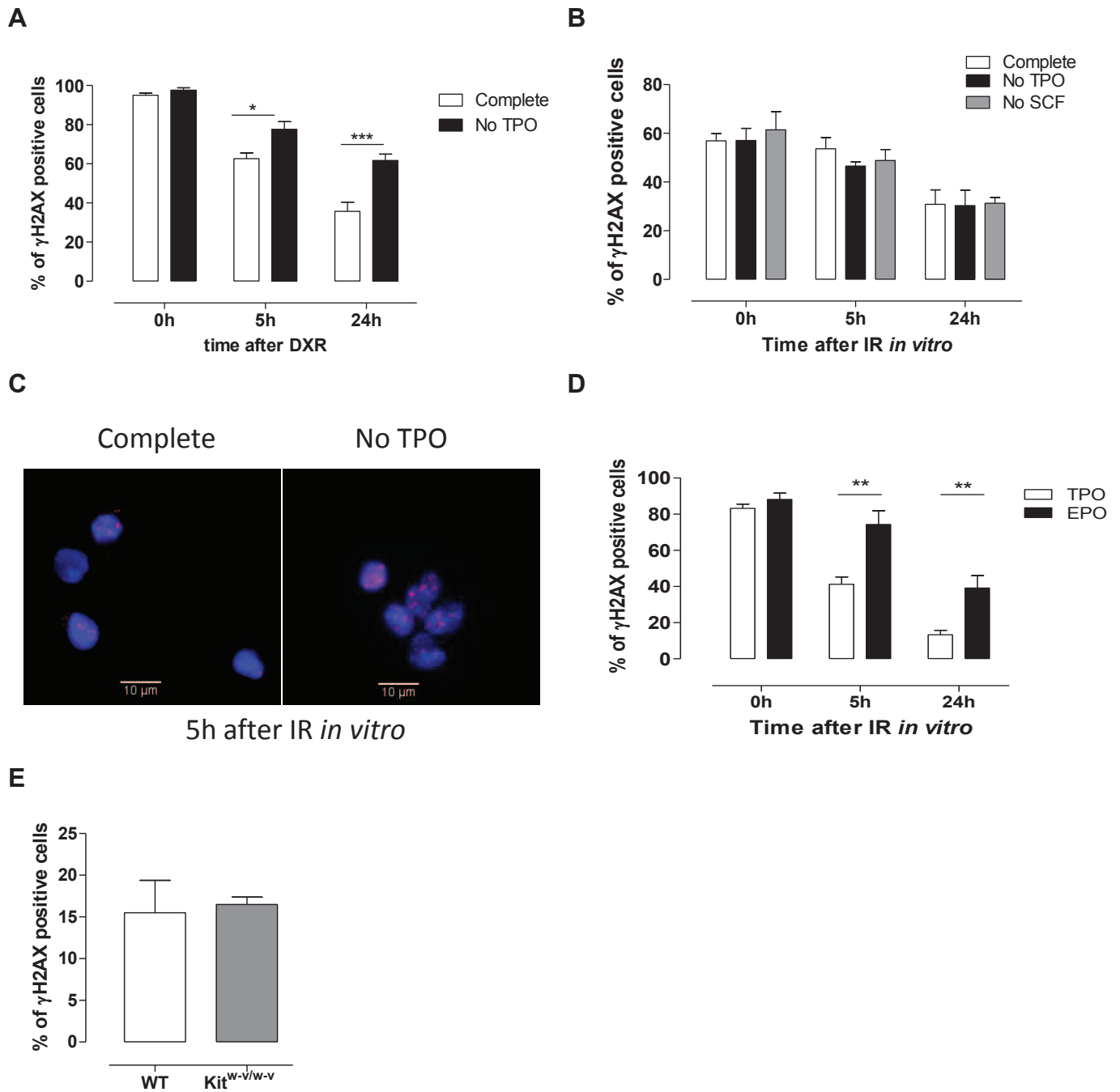


Figure S2. TPO Specifically Promotes DNA Repair, Related to Figure 2

(A, B). Kinetics of γH2AX foci resolution in WT LSK cells treated *in vitro* with 1 μg/ml DXR for 30 min (A) or in Mpl^{-/-} LSK cells irradiated (2 Gy) (B) and cultured in complete medium or without TPO or SCF. Means + SEM, n=3 independent experiments with LSK cells pooled from 3 mice. (C, D) TPO increases DNA repair in human cells. (C) Representative picture of γH2AX foci in CD34⁺CD38⁻ human HSPCs 24h after IR and culture in complete medium or without TPO. (D) Kinetics of IR-induced γH2AX foci resolution in UT7-Mpl cells cultured in EPO or TPO. Means + SEM of 3 independent experiments with at least 100 cells counted per point. (E) γH2AX foci analysis in Kit^{W-V}/Kit^{W-V} mutant and matched WT LSK cells sorted 24h following 2 Gy TBI. Means + SEM (n=4).

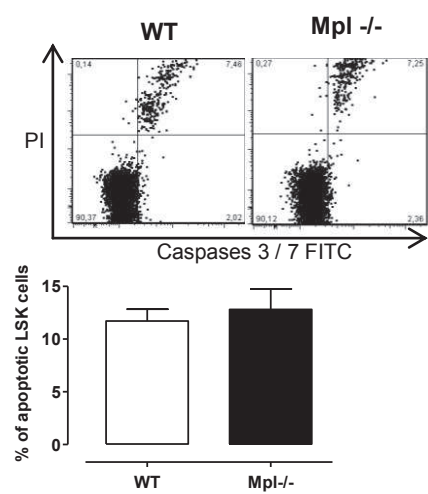
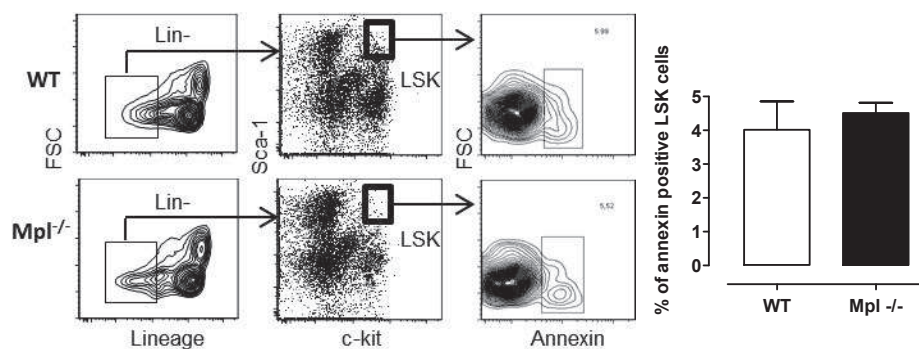
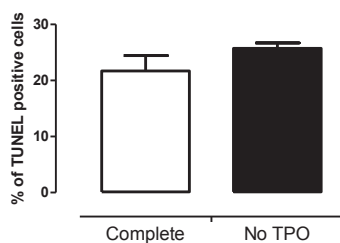
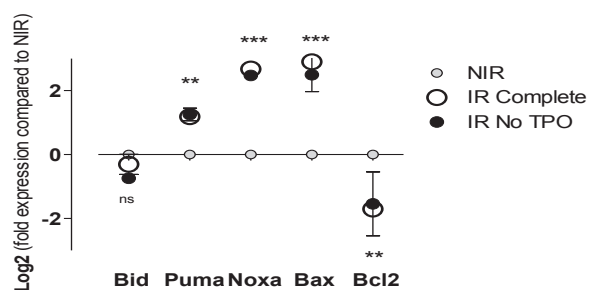
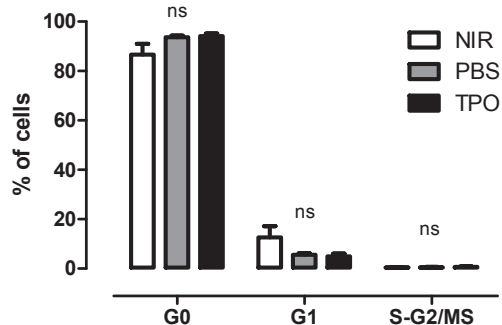
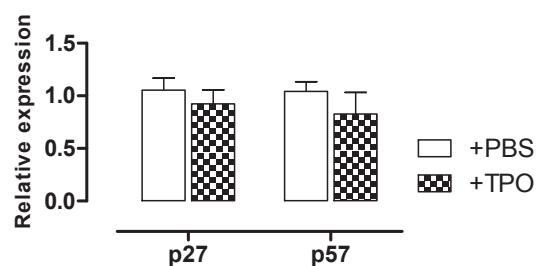
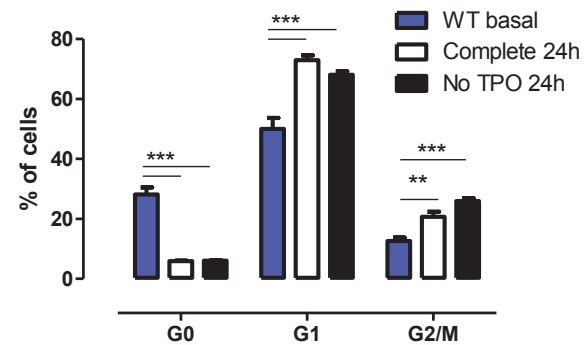
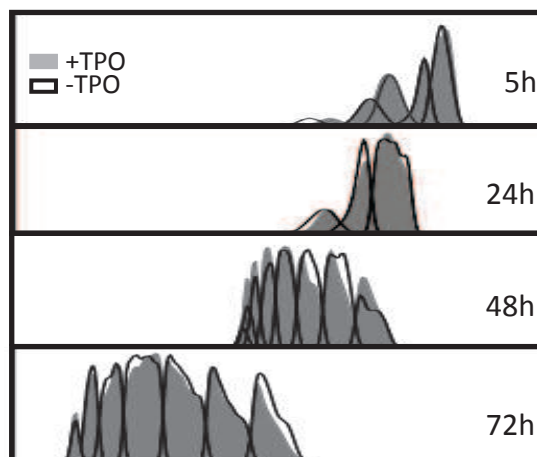
A**B****C****D****E** Gated on LSK CD34-**F****G****H**

Figure S3. TPO Has No Effect on HSPC Cycle or Apoptosis after IR, Related to Figure 3

(A-D) TPO does not increase IR-induced apoptosis or apoptotic gene expression. (A) Representative dot plot and means + SEM percentage of caspase 3/7 and PI positive LSK cells from WT (n=3) and *Mpl^{-/-}* mice (n=3) 24h following IR (2 Gy) *in vitro*. (B) Representative gating strategy and means + SEM percentage of Annexin positive cells in LSK cells isolated from WT (n=3) and *Mpl^{-/-}* (n=3) mice, 24h post 2 Gy TBI. (C) Apoptosis measured by TUNEL assay in WT LSK cells irradiated *in vitro* (2 Gy) and cultured in complete medium or without TPO for 24h. Means and SEM of > 100 cells scored from 4 different mice. (D) Q-PCR analysis of p53-dependent apoptotic genes in WT LSK, non-treated or irradiated 2 Gy *in vitro*, and cultured 5h in complete medium or in medium without TPO. Results are expressed in Log2 compared to the level measured in non-irradiated LSK cells and normalized to the β -actin and the GAPDH levels (n=3). (E-H) TPO has no effect on HSC/HSPC cell cycle status or cell division after IR, *in vivo* or *in vitro*. (E) Pyronin Y and Hoechst staining gated on LSK-CD34⁻ cells from mice not-treated (NIR) or treated with PBS or TPO (8 μ g/kg) and subjected to TBI (2 Gy) 16h before. (F) Q-RT-PCR analysis of the mRNA expression of quiescence genes p27 and p57 in LSK cells isolated 5h post-injection of PBS or TPO and 2 Gy TBI. Results are expressed as fold-change from PBS injection value and normalized to the β -actin and the GAPDH levels (n=4). (G) Pyronin Y and Hoechst staining of LSK cells from WT mice, before (basal) or after culture during 24h in complete medium or in medium without TPO. Means + SEM percent of cells in each phase of cell cycle (n=3). (H) CFSE dilution assays on LSK cells irradiated *in vitro* (2 Gy) and cultured for the indicated times in complete medium (+TPO) or without TPO. Representative experiments out of 4 independent ones performed with cells pooled from 3-4 mice.

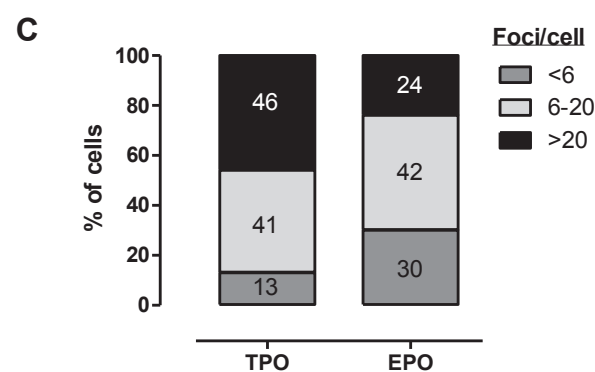
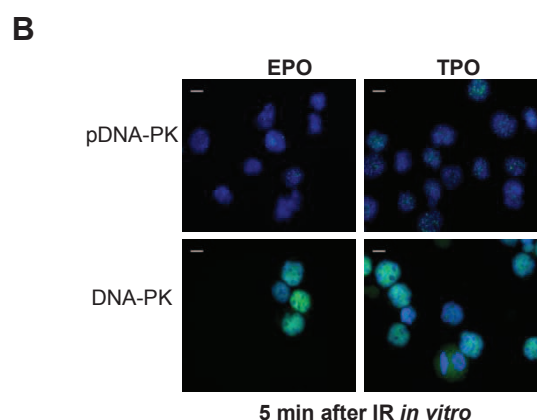
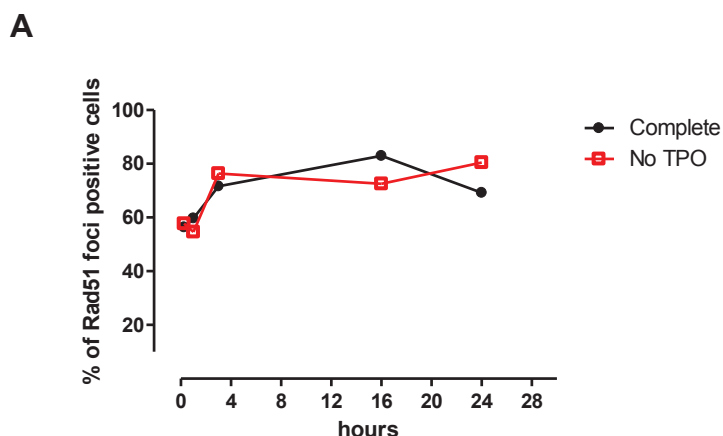


Figure S4. TPO Activates a DNA-PK-Dependent Pathway, Related to Figure 4

(A) TPO does not affect homologous recombination in LSK cells, as assessed by Rad51 staining of isolated LSK cells from WT mice irradiated 2 Gy *in vitro* and cultured in complete medium or in medium without TPO during the indicated times. Representative experiment showing the percentage of cells displaying more than 3 foci. At least 150 cells were counted per point. (B, C) TPO increases DNA-PK phosphorylation in UT7-Mpl cells. (B) Representative view of pThr2506-DNA-PK and total DNA-PK staining (bar 10 μ m) in cells irradiated (2 Gy) and cultured in medium containing EPO or TPO. (C) Repartition pThr2609-DNA-PK foci numbers per cell 5 min after IR. Representative experiment out of 3 performed with more than 50 cells scored.

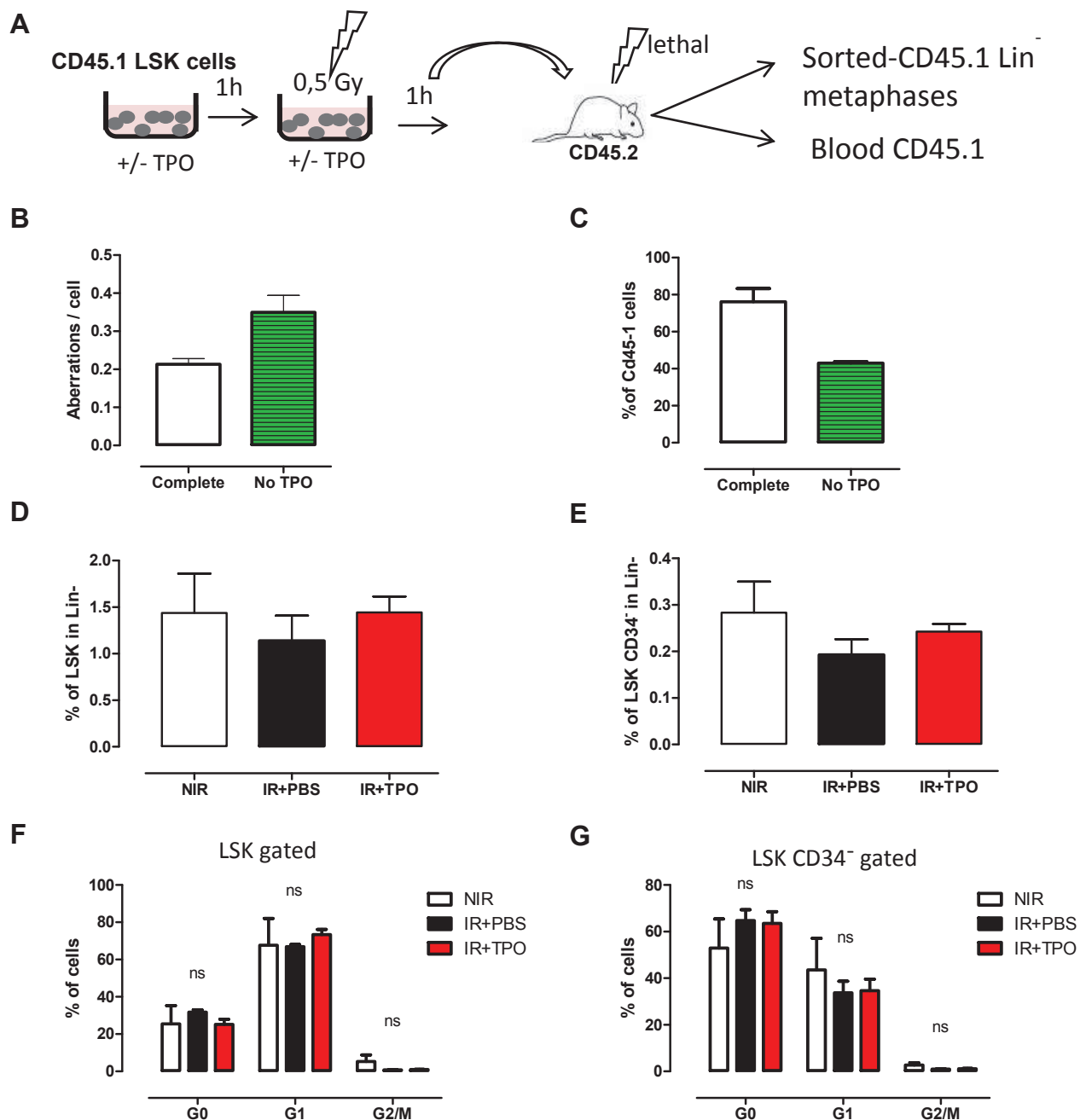


Figure S5. TPO Treatment In Vitro or In Vivo Decreases HSCs' Injury and Mutagenesis without Affecting their Frequencies and Quiescence, Related to Figure 7

(A) Experimental design: 5000 WT CD45.1 LSK cells were cultured in complete medium or without TPO, submitted to IR (0.5 Gy), and injected to lethally irradiated CD45.2 congenic mice. CD45.1 blood chimerism and metaphases from CD45.1 sorted donor-Lin⁻ progenitors were analyzed 4 months later. (B) At least 45 complete metaphases were scored for chromosomal aberrations like fusions, deletions, triradial chromatids and chromatid breaks. (C) CD45-1 chimerism in peripheral blood. Results are means and SEM (n=3). (D-G) WT mice were injected with 8 µg/Kg of TPO or PBS and subjected to TBI (2 Gy) 10 weeks before analysis. Controls are age-matched NIR WT mice. Frequencies (D, E) and cell cycle measured by Hoescht and Pyronin Y staining (F, G) of LSK and LSK CD34⁻ cells. Results are means and SEM (n=4).

SUPPLEMENTAL EXPERIMENTAL PROCEDURES

Antibodies and chemicals

The following antibodies were used: Anti-phosphoDNA-PK (Ser2056 ; Abcam, Cambridge, MA, USA); mouse monoclonal anti-DNA PK (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA); mouse monoclonal anti-H2AX (Millipore, Billerica, MA, USA); goat anti-mouse TPO (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA). Mouse anti-HA (12CA5, Invitrogen); APC-anti-Sca, FITC- or PE-c-Kit, FITC-anti-CD34 and anti-phosphoDNA-PK Thr2609 (Biolegend, San Diego, CA, USA); PrcP- anti-CD4 and PE-anti-CD8 antibodies (BD biosciences); anti-rabbit AlexaFluor-488 and anti-mouse AlexaFluor-488 and 594 (Invitrogen, Carlsbad). The DNA-PK inhibitor NU7441 was purchased from Santa Cruz Inc., Santa Cruz, CA, USA. Romiplostim (N-Plate) was from Amgen and generously provided by Drs D. Bouscary and J. Tamburini.

Apoptosis and clonogenic assays

Apoptosis was analyzed by flow cytometry, either by Annexin V-FITC staining (BD Pharmingen) or by intracellular staining for active caspases 3/7 and propidium iodide, using a Vybrant Fam caspase-3 and-7 assay kit (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) according to manufacturer protocol. Cells were analyzed on LSRII, or Canto II flow cytometers (BD Biosciences) and data were analyzed with the FlowJo software (TreeStar Inc). TUNEL assay was performed on cells cytopun on glass slides as described (Pawlikowska et al., 2010), using the *in situ* Cell Death Detection kit TMR (Roche, Meylan, France). For clonogenic assays, 250 LSK cells were seeded in 24 wells containing MethylCult3434 complete medium with cytokines (StemCell Technologies) supplemented with 50 ng/ml TPO. Colonies were counted on day 7.

Quantitative RT-PCR

Total RNA of LSK was isolated using RNeasy plus micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse-transcribed with superscript vilo cDNA synthesis kit (Invitrogen). All reactions were performed using light cycler fast start DNA Master PLUS Syber Green I (Roche).

The following primers were used: Puma (F: AGTACGAGCGGCGGAGACAA, R: TGCAGAAAAAGTCCCCCGCG); Bax (F: CCGCGTGGTTGCCCTCTTCTAC, R: TTTCCCCTTCCCCCATTCATCC); Noxa (F : CGCTTGCTTTTGGTTCCCTGAG, R: CAAACGACTGCCCCCATACAAT); Bid (F: AACCGCGACCATGGAAAGACC, R: ATGCAGGAGCCGGCGTAAACT) ; Bcl2 (F: ATGGGGTGAAGTGGGGGAGGATTG, R: GGCCAGGCTGAGCAGGGTCTTC) ; p27 (F : TTTAATTGGGTCTCAGGCAAACCTCT, R : CCGTCTGAAACATTTTCTTCTGTTC); p57 (F : GCAAACGTCTGAGATGAGTTAG, R : CATCTCCGGTTCCTGCTACATG); GAPDH (F : ACCACAGTCCATGCCATCAC, R: GTGTTCTACCCCCAATGTG); β -actin (F: GTGGCATCCATGAAACTACAT, R: GGCATAGAGGTCTTTACGG).

Article 2

L'effet protecteur de la TPO sur l'intégrité génomique des CSH nécessite une coopération des voies ERK, NF- κ B et IEX-1.

Bérengère de LAVAL*, Patrycja PAWLIKOWSKA*, Daniela BARBIERI, Corinne BESNARD-GUERIN, Alba CICO, Rajiv KUMAR, Murielle GAUDRY, Véronique BAUD and Françoise PORTEU

Thrombopoietin-induced specific activation of ERK and NF- κ B pathways and their target IEX-1 in hematopoietic stem cells promotes DNA damage repair

Article en cours de soumission

A. Introduction

La TPO pourrait être utilisée pour protéger les CSH lors de traitements radio- ou chimio-thérapeutiques. Cependant, l'administration de TPO peut induire des complications comme une thrombocytose et une fibrose de la moelle osseuse. Il est donc important de connaître les voies de signalisation en aval de la TPO et de son récepteur Mpl pour minimiser les effets secondaires d'une sur-activation du récepteur.

Dans la deuxième partie de mon travail de thèse, je me suis donc attachée à comprendre comment la TPO peut activer la DNA-PK et la voie de réparation NHEJ. Nous avons dans un premier temps, regardé le rôle de IEX-1. En effet, nous avons montré que cette protéine a un rôle dans la réponse aux dommages de l'ADN et qu'elle est induite par la TPO dans une lignée d'origine mégacaryocytaire. Dans un deuxième temps, nous nous sommes intéressés aux voies de signalisation activées par la TPO et pouvant agir avec IEX-1. Deux voies nous ont parues intéressantes, la voie MAPK car les kinases ERK actives lient IEX-1 ce qui régule leur activation, et la voie NF- κ B, impliquée dans la régulation de la transcription de *Iex-1* et activée en réponse à des stress génotoxiques.

B. Résultats

Afin de déterminer si IEX-1 est importante dans la réparation de l'ADN des CSH induite par la TPO, nous avons mesuré son expression. L'ARNm de *Iex-1* est fortement exprimé dans les CSH (LSK et LSK-CD34⁺) comparé aux cellules plus matures (Lin⁻ et Lin⁺), suivant un profil similaire à celui de *c-Mpl*. De plus, l'induction de l'ARNm de *Iex-1* dans les CSPH nécessite l'action combinée de la TPO et de l'irradiation *in vitro* et *in vivo*. Comme les CSPH Mpl^{-/-} (Article 1), les CSPH des souris *Iex-1*^{-/-} présentent spontanément un niveau plus important de dommages de l'ADN, que les cellules sauvages et ont un défaut de réparation après irradiation *in vitro* et *in vivo* en présence de TPO. Ces résultats montrent que les CSH *Iex-1*^{-/-} ne répondent pas à la TPO. Finalement, confirmant l'importance de IEX-1 dans l'effet TPO sur la

réparation de l'ADN, les cellules LSK *Mpl*^{-/-} retrouvent une cinétique de réparation normale quand IEX-1 est surexprimée.

IEX-1 étant la fois un activateur et un substrat de ERK en réponse à la TPO (Hamelin et al., 2006) (Garcia et al., 2002), nous nous sommes intéressés au rôle potentiel de ERK dans la réparation de l'ADN des CSH. Nous avons observé que les CSH des souris déficientes pour *Erk1*, l'une des deux isoformes ERK ou de souris WT mises en présence de l'inhibiteur des MEK, U0126, ont un défaut de résolution des foci γ H2AX après irradiation, normalement observée en présence de TPO. De plus, l'inhibition des MEK mène à une forte diminution de la prise de greffe des CSPH après irradiation de façon similaire à celle observée en absence de TPO montrant que la TPO n'a plus d'effet protecteur sur les CSH en présence d'U0126. Ces différents résultats indiquent que la voie de signalisation ERK est nécessaire à la réparation de l'ADN et la protection des CSH induite par la TPO.

Des expériences de NanoPro et de western blot réalisés sur des CSPH et des CSH montrent que la TPO est l'activateur majeur de la voie ERK dans ces cellules. Cependant, l'induction de l'ARNm de *Iex-1* par la TPO et l'irradiation n'est pas modifiée par l'ajout de l'inhibiteur des MEK suggérant qu'une autre voie de signalisation est impliquée dans l'induction de IEX-1. *Iex-1* a été décrit comme une cible de NF- κ B dans de nombreux types cellulaires (Schäfer et al., 1998) (Wu et al., 1998) (Arlt et al., 2001) (Segev et al., 2000), un voie qui a été montrée activée en réponse aux dommages de l'ADN (Hadian and Krappmann, 2011). Nous montrons que l'irradiation active la voie NF- κ B dans les CSH et que cette activation est potentialisée par la TPO. De plus, cette voie est nécessaire à l'induction de IEX-1 et à la réparation de l'ADN dans les CSPH.

IEX-1 interagit avec pERK au niveau de son site d'ancrage FTF (Garcia et al., 2002). La mutation de ce site empêche la réparation de l'ADN après irradiation montrant l'importance du complexe IEX-1-pERK dans ce processus. En utilisant la technique PLA (Proximity Ligation Assay) qui permet la détection *in situ* par immunofluorescence d'une interaction entre deux protéines, nous montrons que l'irradiation induit une interaction entre pERK et DNA-PKc et que cette interaction est dépendante de la présence de IEX-1. De plus, le blocage de l'interaction entre pERK

et DNA-PK soit en mutant IEX-1 au niveau de son site de fixation de ERK, soit en inhibant la signalisation ERK ou l'expression de IEX-1, diminue la capacité de la TPO à activer DNA-PK en réponse à l'irradiation. Ainsi, la formation d'un complexe tripartite entre IEX-1, pERK et DNA-PKc est nécessaire à l'activation de la DNA-PK et donc à la mise en place de la voie NHEJ.

C. Conclusion

1/ La TPO est l'activateur majeur de la voie ERK dans les CSH et CSPH.

2/ La TPO et l'irradiation agissent ensemble pour activer NF- κ B de façon suffisamment importante pour induire l'expression de IEX-1.

3/ La coopération des voies ERK et NF- κ B est nécessaire pour la réparation de l'ADN des CSH.

4/ IEX-1, pERK et DNA-PK forment un complexe qui permet d'activer la DNA-PK et de promouvoir la NHEJ en réponse à la TPO et à l'irradiation.

D. Article

Thrombopoietin-induced specific activation of ERK and NF- κ B pathways and their target IEX-1 in hematopoietic stem cells promotes DNA damage repair

Bérengère de LAVAL^{1,2,3} *, Patrycja PAWLIKOWSKA^{1,2,3} *, Daniela BARBIERI^{1,2,3}, Corinne BESNARD-GUERIN^{1,2,3} Alba CICO^{1,2,3}, Rajiv KUMAR⁴, Murielle GAUDRY^{1,2,3} §, Véronique BAUD^{1,2,3} and Françoise PORTEU^{1,2,3}, § #

¹ INSERM U1016, Institut Cochin, ² CNRS UMR 8104, ³ Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité, Paris France; INSERM U1016, Institut Cochin, Paris France; ⁴Departments of Internal Medicine, Biochemistry and Molecular Biology, Mayo Clinic, Rochester, MN, USA

§ Present adress : INSERM U1009, Institut Gustave Roussy, Université Paris Sud, Villejuif France.

*Equal contribution

To whom the correspondence should be sent:

Françoise Porteu
INSERM U1009
Institut Gustave Roussy
114 rue Edouard Vaillant
94805 Villejuif, France

francoise.porteu@inserm.fr

INTRODUCTION

Maintenance of genomic stability is crucial for preservation of HSC self-renewal throughout life. DNA damage in hematopoietic stem cell (HSC) can be generated endogenously during normal cellular processes such as replication and has been shown to accumulate during aging. It can also arise through exogenous treatments with a variety of genotoxic agents. In fact, bone marrow, and more particularly HSC injury is one of the most serious limiting factors of therapies with DNA-damaging agents used to treat otherwise curable cancers. Indeed, beside the acute myelosuppression resulting from the death of proliferating hematopoietic progenitor cells (HPCs), exposure to ionizing radiation or chemotherapeutic drugs triggers long-term residual BM injury due to loss of HSC functions (1, 2). This residual BM damage is latent but long lasting and can be reactivated under stress (3). In addition, secondary acute myeloid leukemia (AML) or myelodysplastic syndromes (MDS) are severe adverse complications of these treatments. Findings ways to reduce toxicity of anti-cancer DNA agents through the analysis of HSC response following DNA damage would have major beneficial impact on cancer treatment-related mortality.

Double-strand breaks (DSB) are among the most deleterious DNA lesions. In mammalian cells, DSBs are removed by two main repair pathways: homologous recombination (HR) and non-homologous end joining (NHEJ). NHEJ is regarded as the predominant mechanism for DSB repair in vertebrates in response to irradiation (IR) (4). The DNA-PK complex, composed of the DNA-PK catalytic subunit (DNA-PKc) and the Ku80/Ku70 heterodimer, and the DNA Ligase IV/XRCC4/XLF complex, is required for normal NHEJ. When the NHEJ pathway is impaired, cells use an alternative, slower and DNA-PK-independent NHEJ pathway to bring about DSB-induced genome rearrangements such as translocations and deletions (4-6). Recent reports aimed at delineating the mechanism of DNA repair in quiescent HSCs have shown that they preferentially use nonhomologous end joining (NHEJ) pathway to repair irradiation-induced DNA DSBs (7). DSB repair through NHEJ appears necessary to HSC maintenance, as mice deficient for DNA Ligase IV or KU80 show increased HSC DNA damage and a progressive loss of HSC function during aging (8, 9). In contrast to homologous recombination (HR), NHEJ is intrinsically error-prone and this has been shown to be responsible for increased HSC vulnerability to mutagenesis, as compared to progenitors (7).

We have recently shown that the fidelity and the efficiency of HSC-intrinsic NHEJ-mediated repair can be improved by thrombopoietin (TPO) (10). TPO is the main regulator of megakaryopoiesis and platelet production. Its receptor, Mpl, is also present on HSCs and TPO has important role in these cells, allowing their interaction with the osteoblastic niche, their self-renewal and post-transplant expansion (11-13). TPO promotes DNA repair in

human and mouse HSPCs through NHEJ by directly stimulating DNA-PK activity (10). This effect is critical to preserve long-term HSC genomic stability and function in mice subjected to total to total body irradiation (TBI) or treated with the topoisomerase inhibitors doxorubicin or etoposide. However, mutations resulting in constitutive activation of Mpl or its downstream signaling are involved in myeloproliferative disorders (14) and long-term administration of TPO may cause complications such as myelofibrosis and thrombosis (15). It is therefore critical to determine the signaling pathways evoked in HSCs downstream of Mpl, in the presence or absence of genotoxic stress, to find new means to enhance the desirable TPO effects and minimize the unwanted ones. In addition, since the pathways controlling DNA repair are those used by tumor cells to escape killing by DNA damaging agents, delineating the signaling cascades and factors involved in DNA-PK and NHEJ activation in HSC may be an important step to find new ways to treat leukemic stem cell chemoresistance.

Although many studies have examined signaling downstream of TPO/Mpl in megakaryocytes, little is known about the pathways evoked by this cytokine in HSCs. Our previous data showed that TPO effect on HSC DNA repair is unique as it cannot be replaced by other cytokines acting on HSCs (10). In agreement with the fact that DNA-PK/NHEJ complexes form very quickly after IR, kinetic analysis indicates that the protective effect of TPO requires the presence of TPO shortly before IR; the effect is abolished when TPO is added to the medium after IR. This suggests that TPO triggers a specific signal in HSCs that acts as a priming event to facilitate DNA-PK activation upon treatment with DNA damaging agents. HSC single-cell immunofluorescence and phosphoflow analyses have demonstrated that TPO triggers several signaling cascades in HSCs, including Stat5, ERK and p38 (16-18). Seita and collaborators (18) have shown a specific increase in TPO-, but not in SCF-induced Akt and Stat5 activation in HSCs in mice deficient in the adaptor protein, Lnk, leading to an improvement of their self-renewal. To our knowledge no data have been reported concerning selective TPO/Mpl signaling pathways activated in HSCs and the regulation of their functions under genotoxic stress. Whether these pathways are different from those involved in TPO-mediated HSC maintenance is unknown.

We and others had shown that TPO induces a strong and sustained ERK MAPK activity in megakaryocytes and megakaryocytic cell lines which are necessary for the regulation of proliferation/differentiation balance (19-22). We had identified the early gene *Iex-1* (*IER3*) as a TPO-induced ERK substrate mediating ERK signaling downstream of TPO (23, 24). *Iex-1* is a ubiquitous early response gene induced by various stress stimuli, including IR, infections, inflammatory cytokines and growth factors (25). The cellular functions attributed to IEX-1 protein include regulation of apoptosis, proliferation, various signaling pathway and

proteasome activity (23, 26-30). We have recently reported a role of IEX-1 in the DNA damage responses (31). We show here that IEX-1 is specifically and synergistically induced by TPO and IR in HSCs and is necessary and sufficient to promote TPO-increased DNA-PK activation and NHEJ-mediated DSB repair. This effect requires the unique ability of TPO to activate both ERK and NF- κ B pathways in HSPCs and their cooperation following IR.

MATERIALS AND METHODS

Antibodies and reagents

The following antibodies were used: Anti-pDNA-PK (Ser2056 ; Abcam, Cambridge, MA, USA); mouse monoclonal anti-DNA PK (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA); mouse monoclonal anti-H2AX (Millipore, Billerica, MA, USA); rabbit anti-ERK1 (C-14) and goat anti-IEX-1 (C-20), anti-RelA (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); rabbit monoclonal anti-pERK1/2 (Cell signaling Technology Inc., Danvers, MA, USA); APC-anti-Sca, PE-c-Kit, FITC-anti-CD34 and anti-pDNA-PK Thr2609 (Biolegend, San Diego, CA, USA); anti-rabbit AlexaFluor-488 and anti-mouse AlexaFluor-488 and 594 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), FITC-anti-mouse (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA). The MEK inhibitor, U0126 was from (Promega, Lyon, France). The NF- κ B inhibitor peptide NEMO and its control peptide were kindly donated by Fabrice Agou (Institut Pasteur, Paris, France) and described previously (32). The NF- κ B inhibitor CAS 545380-34-5 was purchased from Calbiochem (Merk, Darmstadt, Germany).

Animals and therapy

Mpl^{-/-} (kindly provided by Dr F. de Sauvage), *Iex-1*^{-/-} and *Erk1*^{-/-} (kindly provided by G. Pages) mice, all backcrossed on C57BL/6 (CD45.2) background for at least 12 generations, were previously described (33-35). WT C57BL/6J (CD45.1 and CD45.2) littermates were purchased from Charles River and Harlan laboratories, respectively. Unless otherwise specified, mice of 8-10 weeks of age were used. All procedures were approved by the Animal Care Committee (registered no. P2.MG.137.10, 2010) and the department director of veterinary services of Paris (agreement no. 75-1064). Lineage negative (Lin⁻), Lin⁻Sca⁺-Kit⁺ (LSK), LSK-Flk2⁻ and LSK-CD34⁻ cells were isolated from BM and stained as described (10). Mouse total body irradiation (TBI) was performed in cesium irradiator IBL 637 (Curie Institute, Paris). In some experiments, retro-orbital injection of TPO (8 μ g/kg body-weight) or PBS was performed 30 min before TBI.

Cell culture

Sorted HSPCs were cultured in StemSpan SFEM (StemCell Technologies) supplemented with recombinant Flt3-Ligand (100 ng/ml), interleukin-3 (IL-3, 10 ng/ml), interleukin-6 (IL-6, 10ng/ml), Stem cell factor (SCF, 100 ng/ml), and 50 ng/ml TPO, all from Peprotech (Rocky Hill, NJ, USA), (complete medium) or in the same medium without TPO. CD34⁺ human HSPCs were isolated from cord blood or cytopheresis, as described (24). UT7-Mpl cells were cultured in α -MEM supplemented with 10% FCS and 2U/ml erythropoietin (EPO, Boehringer Ingelheim). When indicated, NF- κ B or MEK inhibitors were added 30 min before IR. Cells

were irradiated at various doses *in vitro* using a Biobeam 8000 irradiator (Gamma Service Medical GmbH, Leipzig, Germany).

Reconstitution assays

5000 LSKs sorted from C57BL/6 CD45.1 mice subjected were cultured for 1h at 37°C in complete medium or in the absence of TPO in the presence or absence of 10µM MEK inhibitor U0126 or DMSO. Cells were then irradiated (2Gy) or not. After additional 1h incubation, at 37°C, the cells were injected to C57BL/6-CD45.2 congenic mice together with 2×10^5 sorted Sca⁺-CD45.2 cells. Peripheral blood was obtained 4 months later. After red blood cell lysis, cells were stained with anti APC-CD45.2 and FITC-CD45.1 and analyzed by FACS.

Immunofluorescence and proximity ligation assay

Sorted-LSK cells or UT7-Mpl cells were fixed with 3.7 % paraformaldehyde for 10 min at room temperature (RT) and permeabilized with sodium citrate (0.1%). γH2AX and pDNA-PK immunofluorescence analysis were performed as described (10). Foci were counted in at least 100 cells per slide. For the proximity ligation assay, cells were cyto-centrifugated on poly-L-lysine-coated slides labeled with mouse monoclonal anti-DNA-PKc and rabbit anti-pERK1/2 antibodies. Cells were then treated with the Duolink kit using anti-mouse and anti-rabbit secondary antibodies, according to the manufacturer's instructions (Olink Bioscience, Sweden). At least 50 cells were analyzed per slide. All slides were visualized using a Leica DMI 6000 (Wetzlar, Germany) microscope equipped with a 63x1.6 oil-immersion objective and a cooled charge coupled device camera MicroMAX (Princeton Instruments Trenton, NJ, USA). Pictures were analyzed using ImageJ software.

Quantitative RT-PCR

Total RNA of LSK was isolated using RNeasy plus micro kit (Qiagen, Hilden, Germany) and reverse-transcribed with superscript vilo cDNA synthesis kit (Invitrogen). All reactions were performed using light cycler fast start DNA Master PLUS Syber Green I (Roche).

The following primers were used: *Iex-1* (F: ATGCTACCAGCGCCGTGACA;

R: TTAGAAGGCCGCGGATGTTGC); *Gapdh* (F: ACCACAGTCCATGCCATCAC; R: GTGTTCTACCCCAATGTG). *c-Mpl* (F: TCACCTTGGTGACTGCTCTG ; R: GGACTTAGGGCTGCAGTGTC).

Comet and NHEJ assays

Lin⁻ and LSK cells were treated with the various inhibitors for 30 min at 37°C, irradiated and either transferred directly on ice or allowed to recover at 37°C. Neutral comet assays were

performed as previously described (31), using the CometAssay kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA). After drying, slides were stained with Sytox Green (Invitrogen) and comet tails were visualized by a fluorescent microscope Leica DMI 6000 and analyzed using TriTek CometScore software (Tritek Corp., Sumerduck, VA, USA). To test NHEJ activity, WT and *Iex-1*^{-/-} Lin⁻Kit⁺ myeloid progenitor cells were isolated by sorting and cultured in StemSpan SFEM with cytokines (25 ng/ml SCF, 25 ng/ml IL-11, 10 ng/ml IL-3, 50 ng/ml TPO, 10 ng/ml GM-CSF). 24h later, cells were irradiated (2 Gy) and immediately electroporated with 1.5 µg of pEGFP-Pem1-Ad2 plasmid (36), kindly donated by V. Gorbunova (University of Rochester, NY, USA) digested with HindIII and 0.5 µg of pDs Red-Express (Clontech Laboratories, Mountain View, CA, USA) using Amaxa kit V. The day after, cells are washed and stained with anti-Sca-PECy7 antibody. DsRed and GFP expression was analyzed by flow cytometry in the LSK population.

Western blot, NanoPro and EMSA

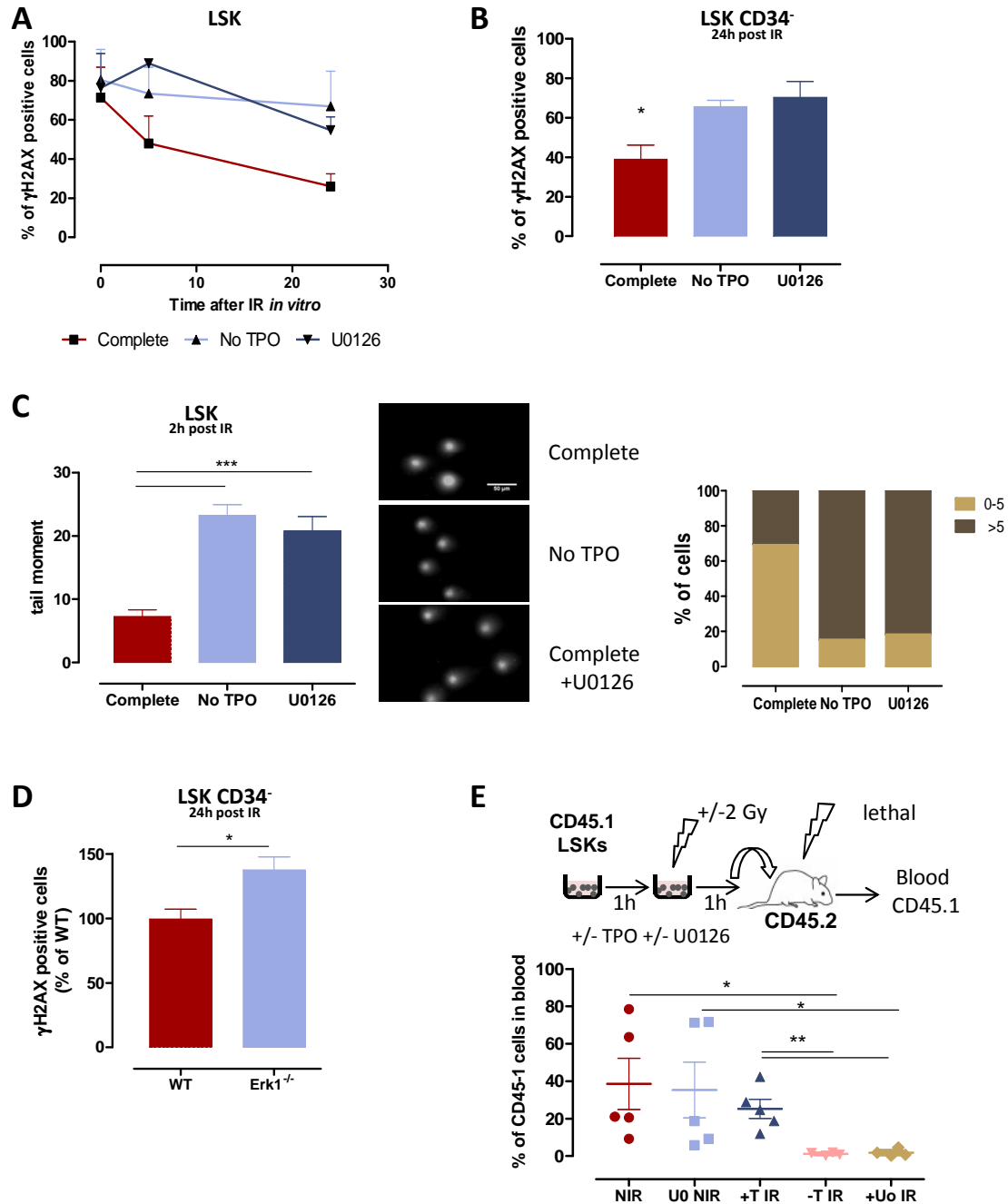
For western blots, 3x10⁴ sorted LSK cells were cultured for 1h at 37°C in IMDM containing 0.2% FCS and either TPO (50 ng/ml), SCF (100 ng/ml) or FLT3-L (100 ng/ml) and subjected to IR (2 Gy) or not. 30 min following IR, the cells were centrifuged and proteins were extracted in 10% Trichloroacetic acid (TCA) for 30 min at 4°C, as described (Magee et al., 2012). The extracts were then centrifuged at 15,000 x g at 4°C for 10 min. The precipitates were washed twice in acetone, dried and solubilized in 9M urea, 2% Triton X-100 and 1 mM DTT. Samples were diluted in LDS loading buffer (Invitrogen), heated at 70°C for 10 min and loaded on 10% Bis-Tris precasted NuPage gels (Invitrogen). Protein transfer on nitrocellulose membranes and western blots analysis were then performed as described previously (Pawlikowska et al., 2010). For pERK1/2 and ERK1/2 quantification using capillary isoelectric focusing immunoassays (37), 3x10⁴ LSK cells were lysed for 15 min on ice in Bicine 20 mM, 0.6% CHAPS pH7.5 buffer supplemented with phosphatase and protease inhibitors (Sigma P0044 and P8340). Lysates were centrifuged at 15,000 x g for 15 min at 4°C and supernatants collected and quickly frozen in dry ice. Analysis was performed on NanoProTM1000 (ProteinSimple, Santa Clara, CA, USA). Briefly, 2.5µl protein samples were mixed with 7.5 µl of a pH5-8 ampholyte solution containing fluorescent pl markers (ProteinSimple). 400 nL of the mixture were separated in capillaries (40 minutes, 21 mW) and proteins were cross-linked to the walls of the capillaries by UV irradiation (100 sec). HRP-labelled secondary antibodies and luminol reagent were from ProteinSimple. Doubly phosphorylated Erk1 and Erk2 (ppERK1 and ppERK2) were quantified using anti-pErk antibodies (Cell Signaling CS4377) and quantification was standardized using antibodies against total ERK molecules (SantaCruz SC94). Indeed, since mouse ppERK2 exhibits the

same isoelectric point as unphosphorylated ERK1, the level of ERK2 activation cannot be simply deduced from a single total ERK analysis. NF- κ B Electrophoretic mobility shift analysis was performed on 5×10^4 LSK cells cultured for 1h in complete medium or in medium without TPO and irradiated (2 Gy). 30 min post-IR, the cells were pelleted and lysed in 25 mM Hepes buffer (PH 7.5) containing 400 mM NaCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.2 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% NP-40 and phosphatase and protease inhibitors, for 20 min at 4°C. After centrifugation of the lysates at 15,000 x g for 10 min, an equal amount of the proteins in the supernatant (at least 1,5 μ g) for each sample was analyzed by. Electrophoretic Mobility Shift Assays (EMSA) for DNA binding activity using the HIV-LTR tandem κ B oligonucleotide as κ B probe (38). For supershift assays, protein extracts were incubated with specific antibodies for 30 min on ice before incubation with the labeled probe.

Statistical analysis

Results were statistically evaluated using either one-way ANOVA and Tukey comparison test or unpaired t-test by GraphPad Prism™ version 5.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results are displayed as means and SEM and the value of *P<0.05 was determined as significant, **P<0.01 or ***P<0.001 as highly significant.

Figure 1



ERK activation is necessary for TPO-mediated DSB repair in HSPCs

(A, B) γ H2AX foci resolution analysis at the indicated times after IR (2Gy) of (A) LSK and (B) LSK-CD34⁺ cells cultured in complete medium in the presence or absence of the MEK inhibitor U0126 (10 μ M), or in medium without TPO. Means \pm SEM (n=3). (C) DSB analysis using neutral comet assay, after IR of LSK cells cultured as in (A). Left: mean of tail moments; right: percent of cells with tail moments >5 or <5. Representative experiment out of 3 similar performed with cells pooled from 3-4 mice. Means \pm SEM of tail moment values analyzed in at least 100 cells. (D) γ H2AX staining in LSK-CD34⁺ cells isolated 16h after TBI of WT and *Erk1*^{-/-} mice. Results are means \pm SEM normalized to the mean of γ H2AX positive cells from WT mice (n=5). (E) Top: Experimental design to test the effect of ERK inhibition on LSK reconstitution ability. LSK cells were cultured as in (A) during 1h before injection in CD45.2 congenic mice lethally irradiated. Bottom: CD45.1-chimerism in peripheral blood 4 months post-transplantation. Each dot represents an individual mouse. Mice have been injected with LSK cells from a pool of 9 mice.

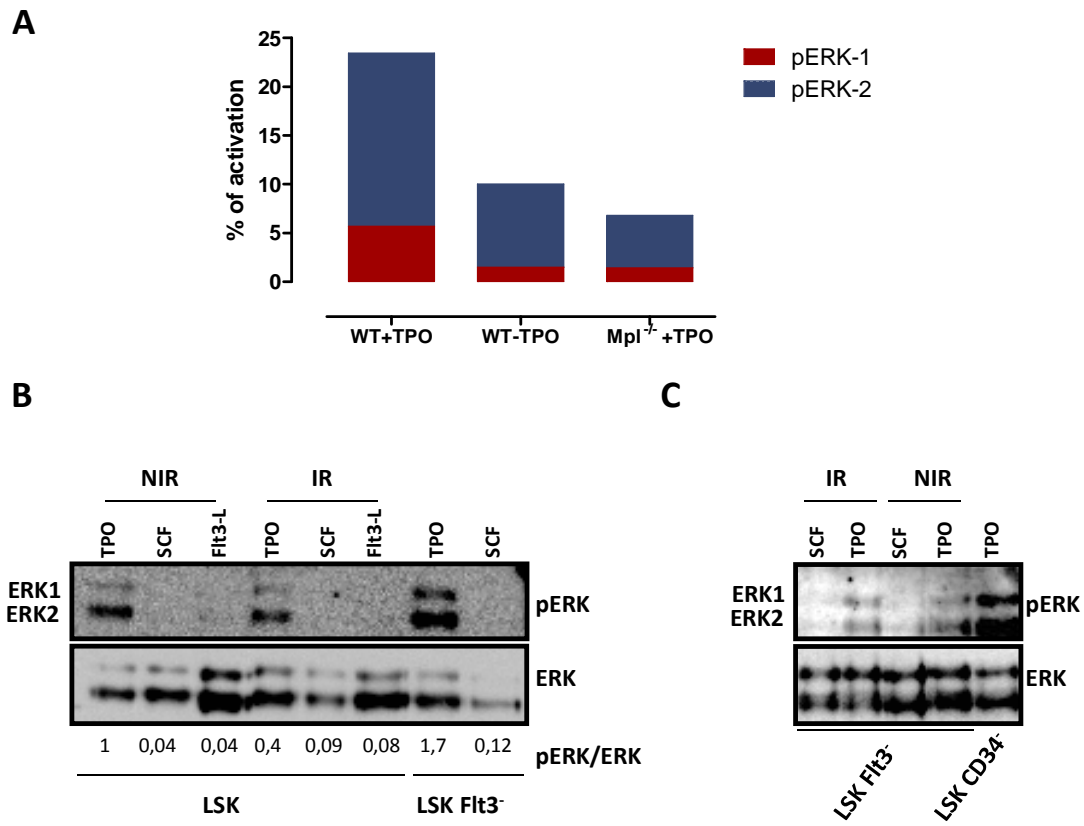
RESULTS

The ERK pathway is required for TPO-mediated DSB repair in HSCs

To determine which TPO-dependent signaling pathways promoted DSB repair in HSCs following IR, we employed specific chemical inhibitors of TPO/cytokine-induced signaling in various types of cells. Lin⁻Sca⁺kit⁺ cells, enriched in HSPCs (here referred to as LSK cells), were cultured in media containing cytokines with TPO (complete medium), or medium without TPO and various specific kinase inhibitors, and then subjected to IR (10). Analysis of γ H2AX foci was used as a surrogate marker indicating the presence DSBs. As previously described, cells cultured in TPO-free medium were greatly impaired in their capacity to resolve IR-induced γ H2AX foci, as compared to cells cultured in complete medium. We found that the MEK inhibitor, U0126, could completely abolish this response (**Figure 1A**). U0126 also prevented TPO-induced increase in γ H2AX disappearance in HSC-enriched LSK-CD34⁺ cell populations (**Figure 1B**). Single-cell comet assays in neutral conditions that measure DSBs, specifically confirmed that the removal of TPO from the medium resulted in increased unrepaired DSBs 2h post IR, as shown by the significant increase in the mean tail moment and in the number of cells harboring long COMET tails in this medium (**Figure 1C, left panel and S1A**). MEK inhibition abolished TPO-induced increase in DNA DSB rejoining (**Figure 1C, right panel**). The effect of U0126 is specific for TPO-mediated repair as it could not be detected in *Mpl*^{-/-} cells. Supporting a role for the ERK pathway in HSC DNA repair, LSK-CD34⁺ HSCs isolated from mice deficient in ERK1, one of the two ERK isoforms, showed increased levels of γ H2AX foci 16h after TBI, as compared to WT HSCs (**Figure 1D**). The capacity of TPO to decrease DNA damage upon IR *in vitro* was also abrogated in ERK1^{-/-} cells down to levels observed in medium without TPO (**Figure S1B**).

As previously described (1, 10), exposure of LSK cells to low doses of IR *in vitro* induced a striking decrease in their long-term reconstituting activity which was completely prevented by a short treatment with TPO before and after IR (**Figure 1E**). This TPO protective effect was abolished when U0126 was added to TPO-containing cultures, leading to engraftment of irradiated cells down to levels of cells treated in TPO-free medium (**Figure 1E**). This loss of HSC function was not resulting from MEK inhibitor-induced increased apoptosis which remained low 24h after IR even when the inhibitor was not removed from the cultures (**Figure S1C**). In addition, U0126 did not alter the reconstitution ability of non-irradiated LSK cells (**Figure 1E**), showing that MEK-ERK pathway inhibition is not generally toxic to HSCs. Taken together, these results indicate that the ERK signaling pathway is required for TPO-induced DNA repair and HSC functional protection after IR.,

Figure 2



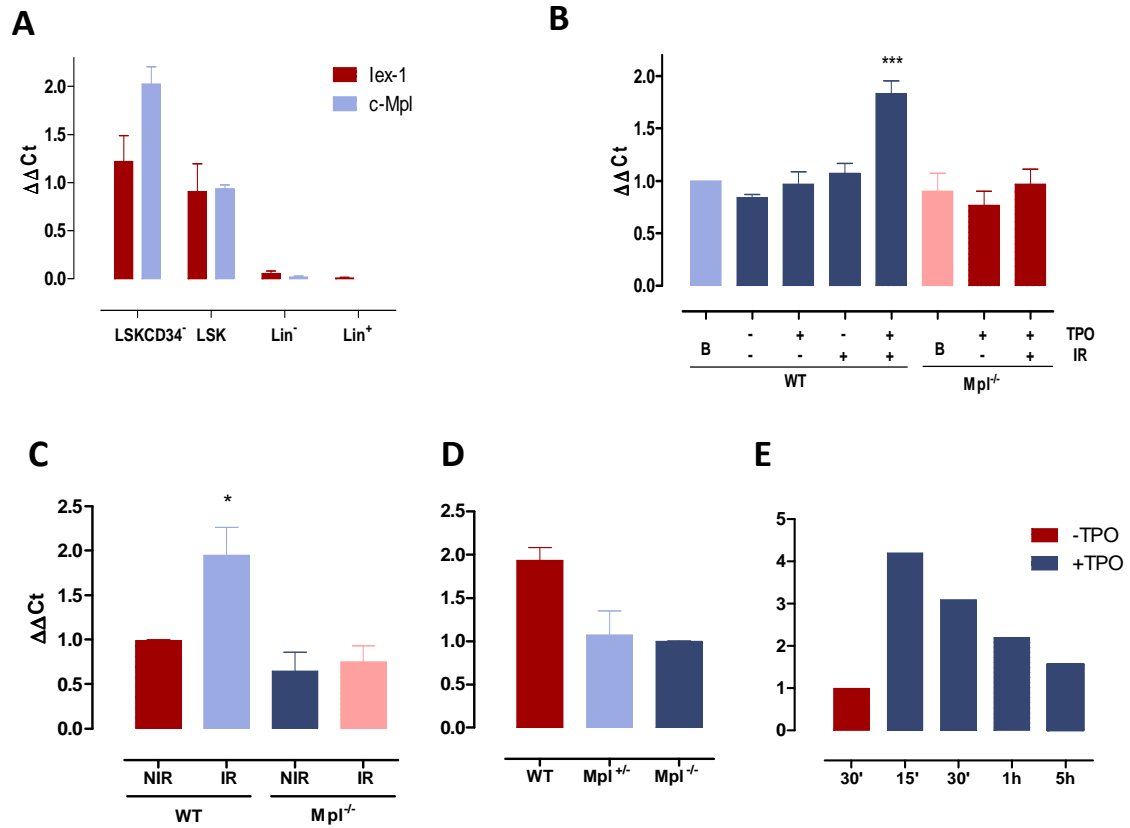
TPO is the major activator of ERKs in HSPCs

(A) Representative experiment of ERK activity obtained by capillary isoelectric focusing immunoassay in WT and Mpl^{-/-} LSK cells cultured in complete medium or without TPO. Results show the area peak value of phosphorylated ERK1 or ERK2, normalized to the area value of ERK total. Representative experiments out of 3 similar performed with cells pooled from 3-5 mice. (B, C) Western blot analysis of ERK activation in LSK, LSK-Flt3⁻ or LSK Flt3-CD34⁻ cell as indicated, cultured with indicated cytokine and irradiated (2 Gy) or not

TPO is the main activator of ERKs in HSPCs

By contrast with what was observed upon removal of TPO, the absence of SCF in the medium had no effect on DSB repair measured by COMET assay, in conditions where TPO is present (**Figure S1A**). This confirms our previous results demonstrating that the effect of TPO is specific and not shared by other cytokines known to have important functions in the maintenance of HSCs in the absence of DNA damage, including SCF, Flt3-L (10), IL-3, FGF1 and IGF2 (unpublished data). All these growth factors are known to be able to activate ERK signaling. However, as far as we know, comparative quantitative assessment of the ability these factors to trigger ERK activation in HSCs and in the same cell population has never been performed. To understand why only the TPO to ERK signal was able to regulate DNA damage repair in HSPCs, we measured the total amount of phosphorylated ERK1 and ERK2 in LSK cells cultured as above in complete or TPO-free medium, using the recently developed capillary isoelectric focusing immunoassay (37). Removal of TPO from the medium led to a striking decrease in total phosphorylated ERK1 and ERK2 levels (**Figure 2A and S2**). Likewise, about 2/3 of ERK activity was lost upon incubation of *Mpl*^{-/-} LSK cells in complete medium containing TPO, as compared to WT cells. Thus, TPO seems to be the major ERK activator in HSPCs. Confirming these results, western blot analysis showed that TPO but not SCF or Flt3-L stimulation could induce a detectable pERK signal (**Figure 2B**). Strikingly, IR did not increase but rather slightly decreased ERK activation induced by TPO (**Figure 2B**). Similar results were observed for LSK-Flt3⁻ and LSK-CD34⁻ cell populations enriched in stem cells (**Figure 2B and C**). In agreement with the increased *Mpl* expression with cell stemness phenotype ((11) and see below), TPO-triggered ERK phosphorylation was higher in LSK-Flt3⁻ and LSK-CD34⁻ cells than in LSK cells.

Figure 3



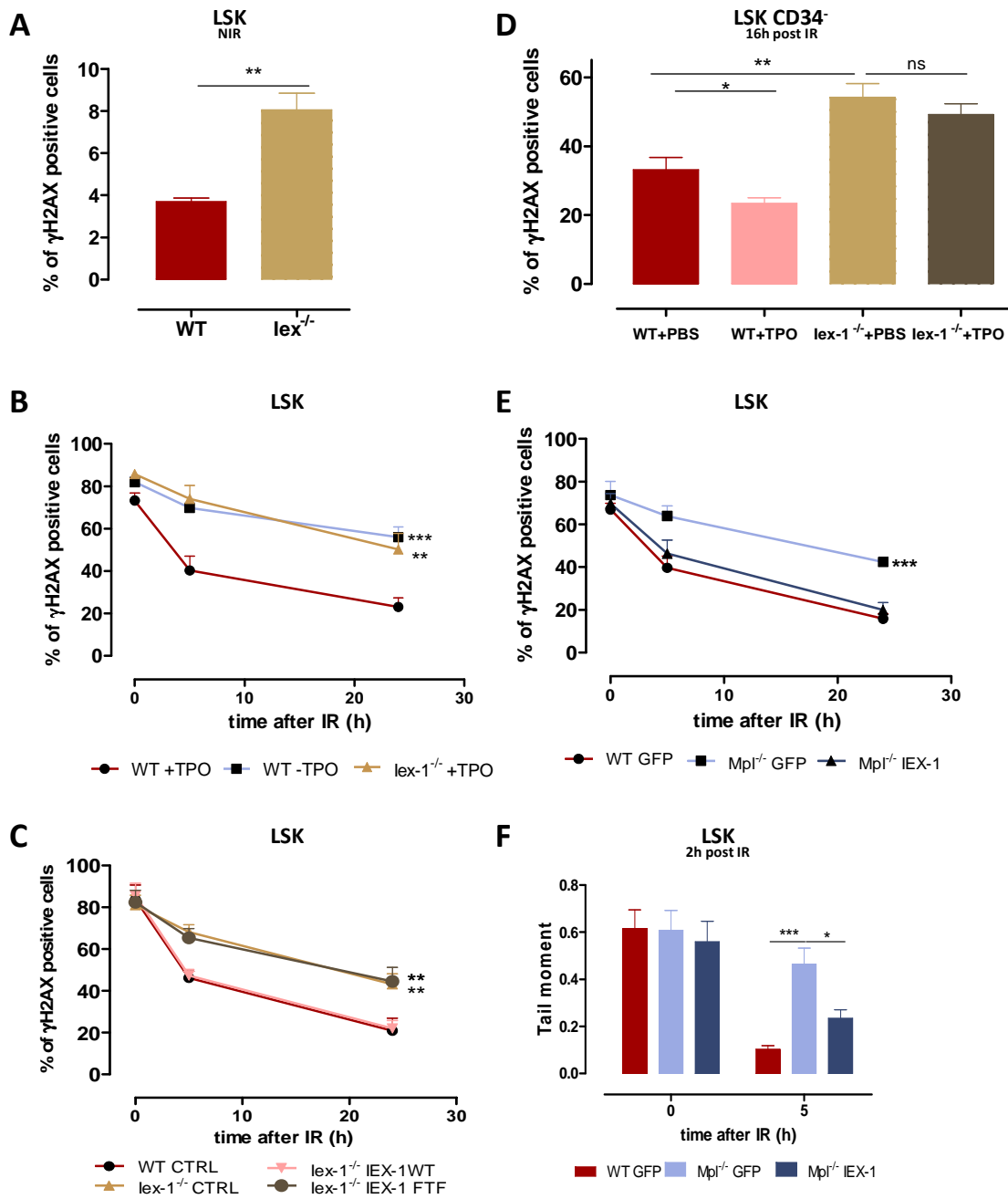
IEX-1 is induced in HSPCs in response to TPO and irradiation

(A) Q-PCR analysis of Mpl and *IEX-1* mRNA levels in different hematopoietic cell populations Means +SEM, (n=3). (B-E) Q-PCR analysis of *IEX-1* expression in LSK cells from (B) WT, *Mpl*^{-/-} and *Mpl*^{+/-} mice cultured *in vitro* in complete medium or without TPO and irradiated or not (2Gy), as indicated. Analysis was performed at 5h (B, D) or at various times after post IR (E). Means +SEM, n=4. (C) *IEX-1* mRNA expression in LSK cells isolated 5h after TBI of WT and *Mpl*^{-/-} mice. Means +SEM, n=3. (D) WT, *Mpl*^{+/-} and *Mpl*^{-/-} have been cultured 5h in complete medium and irradiated *in vitro* (n=4). All the results are normalized with GAPDH expression.

The ERK substrate EX1 is synergistically and specifically induced by TPO and IR in HSCs

We previously identified the early gene *Iex-1/Ier3* as a TPO-induced ERK substrate involved in TPO-mediated function and ERK activity during megakaryocyte differentiation (23, 24). In addition, IEX-1 was found to regulate the DNA damage response upon IR (31), suggesting that this ERK effector could be involved in the unique DSB repair function of TPO/ERK signaling observed in HSPCs. To evaluate this possibility, we measured *Iex-1* mRNA expression in various bone marrow sorted progenitor and HSC cell populations before or after IR and/or TPO treatments. As shown in **Figure 3A**, compatible with the role of IEX-1 in TPO-mediated function in HSPCs, *Iex-1* mRNA basal expression pattern follows that of *Mpl*, being very low in mature Lin⁺ cells and Lin⁻ negative progenitors and increasing greatly in HSC-enriched populations. Upon IR *in vitro*, LSK cells cultured in complete medium containing TPO showed a 2-fold increase in *Iex-1* mRNA levels (**Figure 3B**). No such increase could be observed in the absence of IR or when IR treatment was applied in TPO-free medium. While basal *Iex-1* mRNA levels were only slightly decreased in *Mpl*^{-/-} LSK cells from non-irradiated mice, no change in *Iex-1* could be observed in these cells upon IR treatment, in the presence or absence of TPO in the medium (**Figure 3B**). Likewise, *Iex-1* mRNA levels were significantly increased *in vivo* in LSK cells isolated from WT but not from *Mpl*^{-/-} mice 5h after their TBI, as compared to cells from non-treated mice (**Figure 3C**). Altogether, these results indicate that *Iex-1* mRNA induction in HSPCs requires TPO and IR signals, both *in vitro* and *in vivo*. Supporting a role for *Iex-1* induction in TPO-mediated HSC responses to DNA damage, *Iex-1* mRNA expression remained unchanged in irradiated heterozygous *Mpl*^{+/-} cells in which this function is impaired (10) (**Figure 3D**). Kinetics studies showed that *Iex-1* mRNA induction upon TPO and IR is rapid (**Figure 3D**), a timing which is compatible with that of an early response gene and with the rapid effect of TPO on the repair of IR-induced DNA damage.

Figure 4



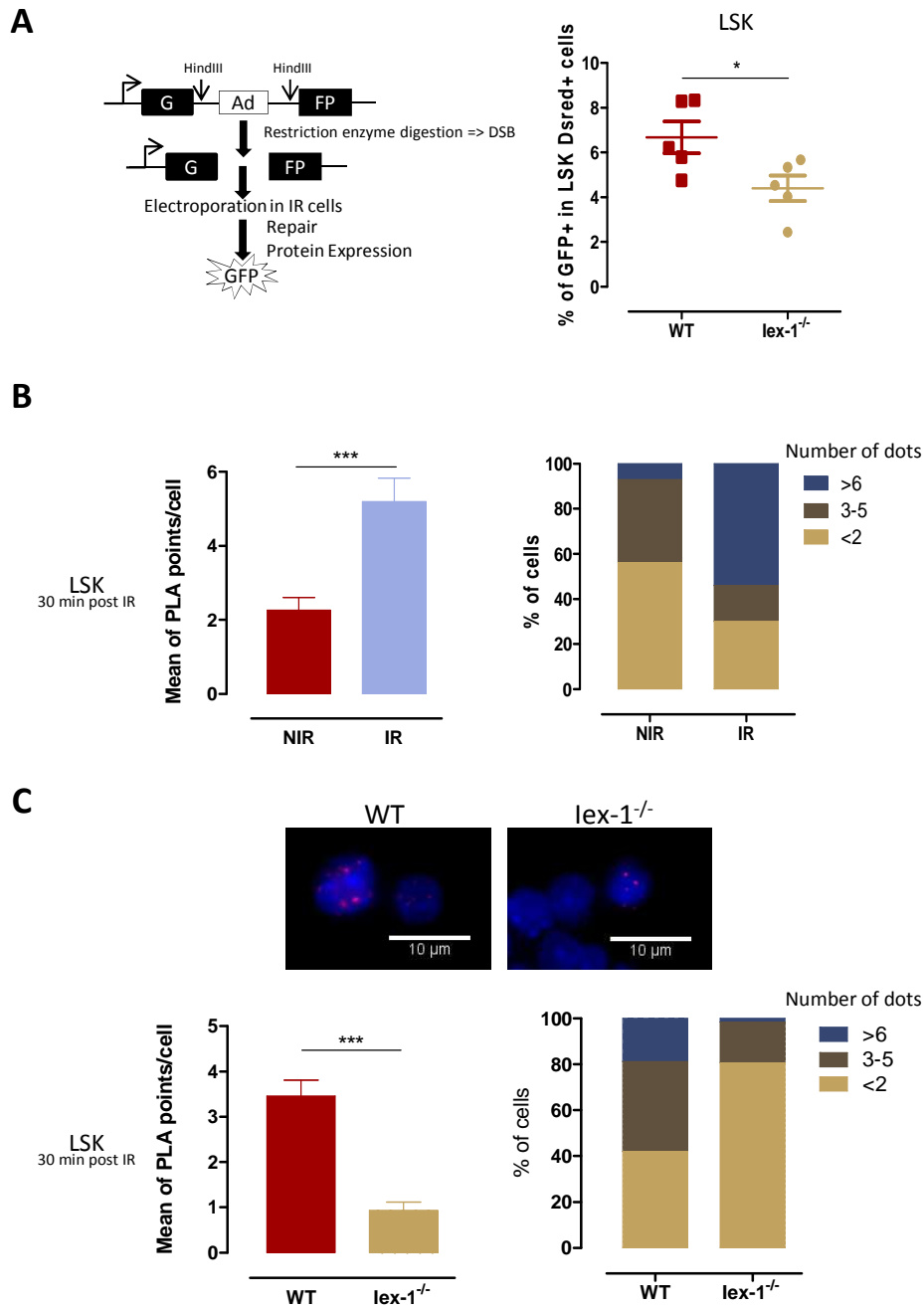
IEX-1 is necessary and sufficient for TPO-mediated DSB repair in HSPCs

(A) Percentage of γH2AX positive LSK cells isolated from non-treated WT and *lex-1*^{-/-} mice. Means +SEM, n=3. (B, C) Kinetics of γH2AX foci resolution after IR of WT and *lex-1*^{-/-} LSK cells, cultured as indicated, before (B) or after (C) infection with lentiviruses expressing GFP only or GFP with IEX-1-WT or IEX-1-FTF mutant and cultured in complete medium. Means +SEM of 3 independent experiments performed with pools of 5-10 mice. (D) γH2AX staining in LSK-CD34⁺ isolated from WT and *lex-1*^{-/-} mice 16h after TPO (8 μg/kg body weight) or PBS injection and TBI (2 Gy). (E, F) Kinetics of γH2AX foci (E) and comet tail resolution (F) after IR of WT and *Mpl*^{-/-} LSK cells infected, as in (C) and cultured in complete medium. Means + SEM are shown. (E) n=4; (F) Means + SEM of tail moment values analyzed in at least 35 cells.

IEX-1 expression is required for TPO-induced DNA repair upon IR

As $Mpl^{-/-}$ HSPCs, HSPCs isolated from non-treated *lex-1*-deficient mice (*lex-1*^{-/-}) showed a spontaneous increase in DNA damage, as detected by the presence of higher levels of γ H2AX foci than in WT cells (**Figure 4A**). By contrast with what was observed with WT cells upon IR *in vitro*, the presence of TPO in the medium did not accelerate the resolution of γ H2AX foci in *lex-1*^{-/-} cells which remained almost unpaired 24h after IR (**Figure 4B** and **S3**). The defect was similar in its extent to that observed in WT cells treated in the absence of TPO showing that *lex-1*-deficient HSPCs do not respond to TPO signal. Infection of *lex-1*^{-/-} LSK cells with an *lex-1*-encoding lentiviral vector, but not with an empty vector, rescued completely TPO-induced increase in γ H2AX foci removal (**Figure 4C**), indicating that the defect in DNA repair of *lex-1*^{-/-} LSK cells is due to *lex-1* deficiency. The necessary role of IEX-1 at ensuring TPO-mediated DSB repair was also observed in HSCs *in vivo*. Indeed, in agreement with a DNA repair defect in *lex-1* deficient HSCs, TBI-induced DNA damage was stronger in LSK-CD34⁻ *lex-1*^{-/-} cells than in their WT counterparts (**Figure 4D**). Moreover, TPO injection to WT, but not to *lex-1*^{-/-}, mice just before TBI significantly reduced the number of LSK-CD34⁻ harboring γ H2AX foci at 16h compared to mice treated with PBS alone, showing that *lex-1*^{-/-} HSCs are unable to respond to TPO *in vivo*. Finally, further confirming the importance of IEX-1 expression in the ability of TPO to improve HSC DSB repair, $Mpl^{-/-}$ LSK cells regained γ H2AX foci disappearance (**Figure 4E**) and DSB rejoining (**Figure 4F**) kinetics in the presence of TPO upon infection with a vector expressing IEX-1 and GFP but not with a vector expressing GFP alone.

Figure 5



pERK and DNA-PKc form a complex that requires the presence IEX-1

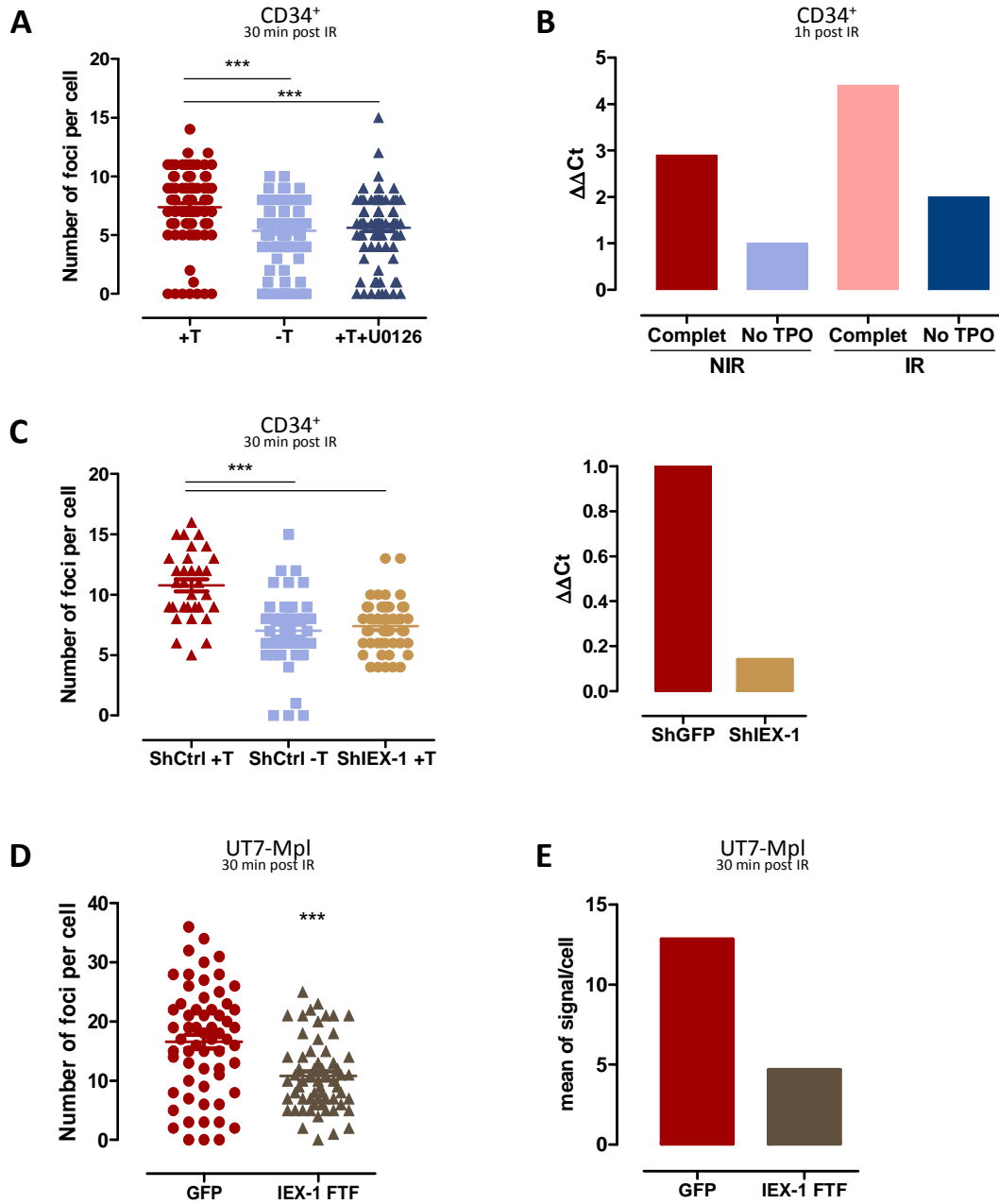
(A) Quantification of NHEJ activity in LSK of WT and *lex-1*^{-/-}. Left: experimental procedure; right: results are expressed as the percent of GFP⁺ cells in LSK DsRed⁺ cells (n=5). (B, C) Proximity ligation Assay between pERK and DNA-PKc in LSK cells from (B) WT and (C) from WT and *lex-1*^{-/-} mice. Cells were cultured in complete medium and analyzed 30 min after IR (2 Gy) or not. Representative pictures and means + SEM of number of PLA dots per cell (left) and percent of cells with the indicated amounts of dots (right) are shown.

IEX1 and ERK form a complex with DNA-PKc that is required for DNA-PK activation by TPO

Our previous results showed that TPO regulates HSC DSB repair by increasing specifically IR-induced DNA-PK activation and classical NHEJ repair signaling. To ensure that IEX-1 and TPO act on the same DNA repair pathway, we directly analyzed NHEJ activity in *Iex-1* sufficient or insufficient LSK cells. For that, WT and *Iex-1*^{-/-} deficient Lin-Kit⁺ progenitors were transfected with a digested pEGFP-Pem1-Ad2 plasmid (10) and re-ligation of the DSB-ends *in vivo* was assessed by measuring GFP expression (**Figure 5A, left panel**), gated on the LSK population, 24h after IR and culture in complete medium containing TPO. This assay showed that in response to IR, NHEJ was significantly impaired in *Iex-1*^{-/-} HSPCs, as compared to WT cells (**Figure 5A, right panel**).

IEX-1 displays a FXF specific docking site for activated phosphorylated pERK1/2 forms and has been shown to form a complex with these kinases (23, 39). As shown in **Figure 4C**, expression IEX-1-FTF mutated at this site could not rescue the DNA damage defect of *Iex-1*^{-/-} HSPCs, suggesting that IEX-1/pERK complex formation is required for this function. To examine if ERK bound to IEX-1 may affect DNA-PK activation in HSPCs, we examined whether interactions could occur between these proteins. To address this question, we used a Proximity Ligation Assay (PLA) which allows detection *in situ* of physical protein-protein interactions by immunofluorescence and requires small cell numbers. Both pERK and pDNA-PK levels are increased upon TPO stimulation. To minimize the variations in interactions between these proteins that might reflect these changes, we chose to analyze the interaction between the DNA-PK catalytic subunit, DNA-PKc, and pERK in LSK cells cultured in complete medium, i.e. in the presence of TPO. We have previously shown that neither the total level of DNA-PKc nor its localization was altered by TPO and IR treatments (10). **Figure 5B** shows that PLA labeling between pERK and DNA-PKc could be detected at a low level in LSK cells after cultured for 1h in complete medium and was significantly increased upon IR, particularly with a strong augmentation in the number of cells harboring more than 6 PLA fluorescence dots. We were not able perform PLA with the available anti-IEX-1 antibodies that do not detect IEX-1 protein in primary cells. Thus, we tested the role of IEX-1 in the complex formation by performing PLA in *Iex-1*^{-/-} LSK cells. We found that the DNA-PK/pERK interaction was greatly decreased in *Iex-1*^{-/-} cells as compared to WT, with 2% and 20% of the cells harboring more than 6 dots, respectively (**Figure 5C**). These results indicate that IR induces *in situ* interaction between endogenous pERK and DNA-PKc and that this interaction is dependent on the presence of IEX-1.

Figure 6



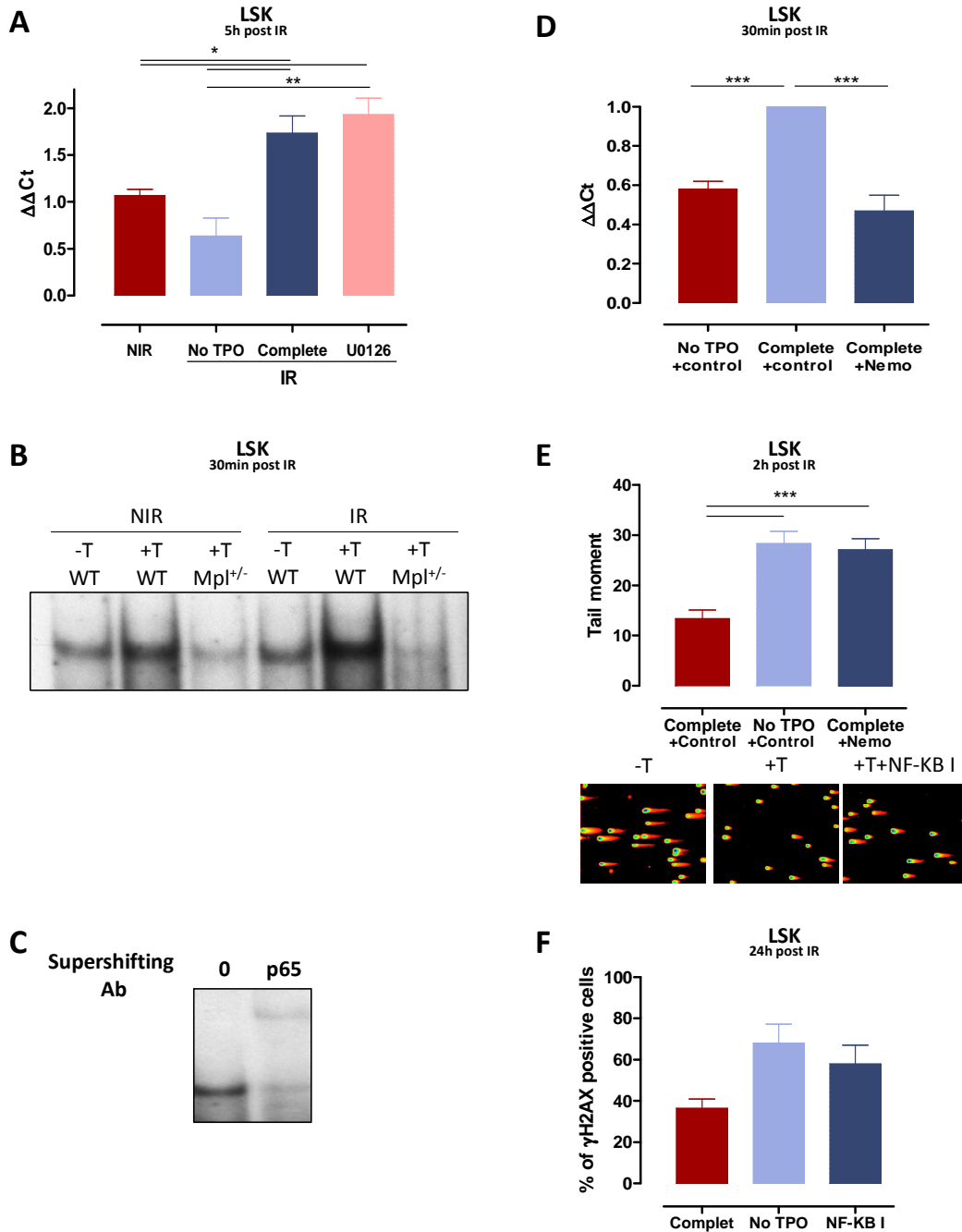
ERK and IEX-1 are necessary for DNA-PK activation in human and mouse HSPC

(A) Number of Ser2056-pDNA-PK foci 30 min after IR of CD34⁺ human progenitor cells cultured without TPO or in complete medium in the presence or absence of 10μM U0126. Means \pm SEM of foci from three independent experiments. (B) Representative experiment for transcriptional *Iex-1* expression in human CD34⁺ cells, 1h after IR or not and cultured in complete medium or without TPO. Means \pm SEM of foci counted in three independent experiments. (C) Left: Number of pSer2056-pDNA-PK 30 min after IR of human CD34⁺ infected with lentiviruses encoding control shRNA or IEX-1 ShRNA and cultured as in (B). Means \pm SEM foci per cell from three independent experiments. Right: Transcriptional analysis of *Iex-1* in the shRNA infected cells analyzed on the left. (D) Number of Thr2609-pDNA-PK per cell 30 min after irradiation of UT7-Mpl infected with control (Δ U3) or with IEX-1-FTF. Means \pm SEM of a representative experiment. (E) pERK/DNA-PKc interaction using PLA in UT7-Mpl cell treated as in (D).

We next assessed whether the formation of this complex is required for TPO-increased DNA-PK activation upon IR. Ser2056- and Thr2609-phospho-DNA-PK foci formation is a useful *in vivo* functional marker of IR-induced DNA-PK activation and is required for NHEJ (40, 41). In the absence of the available anti-pDNA-PK antibodies reacting with mouse cells, we examined this marker using cord blood-derived human CD34⁺ HSPCs. As shown in **Figure 6A**, MEK inhibition abolished the ability of TPO to increase IR-induced Ser2506-pDNA-PK foci formation in these cells. Similar results were found for Thr2609-pDNA-PK phosphorylation induced in UT7-Mpl cells, a human cell line expressing Mpl in which TPO was found to enhance DNA-PK-dependent NHEJ repair (**Figure S4A**) (10, 24).

Similarly to mouse HSPCs, TPO and IR act additively to induce *Iex-1* mRNA and protein expression in UT7-Mpl cells (**Figure S4B and C**) and in CD34⁺ HSPCs (**Figure 6B**). DNA-PK phosphorylation in the presence of TPO and IR was decreased down to the levels obtained in the absence of TPO in CD34⁺ and UT7-Mpl cells in which *Iex-1* expression was knocked-down with lentivirus expressing IEX-1 shRNA (31), as compared to cells expressing control shGFP (Figure 6C and S4D). Interestingly, IR+TPO-induced both pDNA-PK foci formation and pERK/DNA-PKc *in situ* interaction (**Figure 6D and E**) were inhibited upon expression the IEX-1-FTF mutant as compared to vector expressing GFP alone. These results indicate that this mutant behaves as a dominant negative species on DNA-PK activation and pERK/DNA-PKc interaction. They suggest that TPO induces the formation of a tripartite complex pERK/IEX-1/DNA-PKc upon IR. Preventing the interaction between DNA-PK and pERK either through mutation of IEX-1's ERK docking site, inhibition of ERK signaling, or *Iex-1* deficiency, alter the ability of TPO to increase DNA-PK activation upon IR.

Figure 7



NF- κ B is required for TPO-induced IEX-1 expression and DSB repair in HSPCs.

(A) Q-PCR analysis of *lex-1* mRNA expression in LSK cells 5h after culture in TPO-free medium or in complete (comp) medium in the presence or absence of U0126 (10 μ M) and IR. Means + SEM from 3 independent experiments with cells from 3-5 mice. (B) NF- κ B activation analysis by EMSA in WT and Mpl^{+/-} LSK cells cultured in complete medium or without TPO and 30 min after IR or not. Representative experiment out of 4 similar performed. (C) Supershift analysis using with anti-p65 RelA antibody or not (0) in WT LSK cells 30 min post-IR in the presence of TPO. (D) *lex-1* mRNA expression 30 min after IR in LSK cells cultured in medium without TPO or in complete medium containing either Nemo (10 μ M) or a control peptide. Means + SEM from 4 independent experiments performed with cells from 3-5 mice. (E) Tail moment analysis of WT LSK cultured as in (D) and 2h after IR. Representative pictures and means + SEM of the tail moment values measured in at least 60 cells. Representative experiments out of 3 performed. (F) γ H2AX staining in LSK cell cultured like in (D) and 24h after irradiation. Means + SEM of 3 independent experiments with at least 100 cells counted per condition.

TPO-increased NF- κ B activation is required for IEX-1 expression upon IR

The above results showing that IR decreased TPO-induced ERK activation suggest that another pathway might be involved in the synergistic induction of *Iex-1* mRNA by TPO and IR in HSPCs. In agreement with this hypothesis, *Iex-1* mRNA induction in LSK cells treated with TPO and IR *in vitro* remained unchanged in the presence of MEK inhibitor (**Figure 7A**).

Iex-1 has been described as a NF- κ B target gene in various types of cells (25), a pathway that has been shown to be activated in response to DNA damage (42). This prompted us to evaluate the status of NF- κ B activation upon TPO-mediated DSB repair in irradiated HSPCs. EMSA analysis showed that NF- κ B DNA binding activity was induced 30 min after TPO addition to the medium (**Figure 7B**). A weak κ B DNA binding was also detected upon IR treatment alone in the absence of TPO. However, correlating with the effect of TPO on IEX-1 expression, NF- κ B DNA binding activity was greatly enhanced when both stimuli were applied together. Supershift analysis indicated that the NF- κ B complexes induced by TPO and IR treatment contain the NF- κ B subunit RelA (**Figure 7C**). NF- κ B activation was abolished in *Mpl*^{+/-} cells which are unable to increase *Iex-1* mRNA upon IR. Importantly, increase in *Iex-1* mRNA expression upon TPO+IR treatment was completely abolished upon incubation with the NEMO peptide, a specific inhibitor leading to dissociation of the IKK complex (32), while the control inactive peptide had no effect (**Figure 7D**), thus indicating that TPO-mediated NF- κ B pathway activation is required for IEX-1 induction in HSPCs. Moreover, the NEMO peptide as well as another NF- κ B inhibitor, CAS 545380-34-5, acting at the level of NF- κ B transcription, blocked TPO-accelerated DSB joining measured in neutral comet assays (**Figure 7E and F and S5**). This further supports the requirement of NF- κ B-mediated increase in IEX-1 expression to ensure TPO effect on DNA repair upon irradiation.

Altogether, these data show that TPO-triggered ERK and NF- κ B pathways leading to IEX-1 expression and activation upon DNA damage constitute a unique pathway allowing selective activation of DNA-PK/NHEJ pathway in HSCPs in response to TPO and IR.

DISCUSSION

There has been a recent increase in data concerning the signaling pathways activated in HSCs. Studies with mice deficient in various kinases or signaling intermediates have led to a rapid increase in knowledge regarding the pathways controlling HSC function, self-renewal and quiescence. Although signaling pathways are shared by growth factors, it is known that their activation may vary with the cellular context. In addition, within a unique cellular context, responses to individual factors can vary during ontogeny, leading to different final functional outcome. This is due to compartmentalization of signaling, the presence or absence of specific substrates within these pathways, and the duration or the localization of the activation signal. Likewise, leukemic stem cells can display constitutive activation of several signaling pathways while being addicted and therefore sensitive to only one of them for their proliferation.

Little is known concerning the unique signals triggered by a given cytokine in HSCs. In addition, there is a paucity of information concerning the pathways activated by these growth factors in regulating HSC response following environmental stresses such as those induced by chemotherapeutic drugs or IR. We show here that the specific TPO-mediated increase in DSB repair in HSPCs is due to its unique capacity to activate both ERK and NF- κ B pathways which cooperate to induce and activate the early gene and ERK substrate *Iex-1* upon DNA damage in these cells.

Previous studies using Phosphoflow assays have reported that ERKs can be activated by SCF and Flt3-L in HSPCs (16). However, our results indicate that TPO is the main activator of this pathway in both LSK and HSC-enriched cells. Indeed, removal of TPO from WT cell cultures or using *Mpl*^{-/-} cells led to 65% decrease in ERK1/2 phosphorylation signal despite the presence of Il-3, Il-6, SCF and Flt3-L in the medium. Moreover, ERK1/2 activation could be detected by western blots after single stimulation with TPO, but not with SCF. This might be due to the fact that our studies were performed after 30 min of treatment, a time required before IR to stimulate TPO-mediated repair (10), while the maximum activation of ERKs by SCF has been found around 10 min. On the other hand, SCF-mediated ERK activation was found to be higher in Lin⁻Kit⁺ myeloid progenitors than in HSCs despite of the lower SCF receptor surface expression in the former (Du et al., stem cells, 2012). TPO-induced ERK activation was found to augment together with *Mpl* expression levels in LSK-Flk2⁻ and LSK-CD34⁺ HSC-enriched cell populations, as compared to LSK cells. This correlates with our previous results showing that the extent of TPO-induced DNA damage repair increases with stemness (de Laval et al., 2013).

Our results show that activation of the ERK pathway downstream of TPO is strictly required for HSC DSB repair and to prevent HSC loss of function following IR, as shown by the capacity of MEK inhibitors to completely abolish these two TPO effects. By contrast, U0126 have no effect on the reconstitution ability of non-irradiated cells. This suggests that the ERK pathway does not play a crucial role in TPO-controlled HSC function in the absence of DNA damaging triggers. This assumption is supported by the fact that HSC expressing a truncated Mpl receptor and harboring a marked defect in its ability to stimulate ERK activation is able to maintain stem cell activity and self-renewal (43). In addition, our previous data showed that ERK1^{-/-} HSCs have normal function and are present at normal frequency in limiting dilution competitive transplantation experiments (34), while displaying increased DNA damage upon IR and loss of TPO-mediated increased DNA repair. However, it has been recently reported that mice deficient for both ERK1 and ERK2 in hematopoietic cells display decreased HSC numbers due to decreased survival and proliferation. These HSCs contribute poorly to hematopoiesis in competitive transplants (44). The difference between this study and ours might be due the fact that we induced a transient inhibition of ERKs by applying the MEK inhibitor for 2h only before transplantation, contrasting with a total removal of ERK signal induced by ERK1/2 ablation. On the other hand, although TPO is the main activator of ERKs in HSPCs and plays a major role in HSC maintenance and expansion post-transplantation, it is possible that total ERK1/2 deficiency alters significantly HSPC proliferation and survival in responses to another growth or niche factor *in vivo*.

ERK inhibition abolished TPO-mediated increased in DNA-PK auto-phosphorylation on Ser2026 and T2609 in human HSPCs and UT7-Mpl cells. Using Proximity Ligation Assay we found that pERK and DNA-PKc form a complex that is greatly increased upon IR in these cells. Several studies have shown that γ -irradiation or other genotoxic agents can trigger ERK activation in different types of cell lines and have implied this pathway in the proper execution of the cellular DNA damage responses through the modulation of apoptosis or G2/M checkpoint (45). However, few data have been described concerning the involvement of ERK kinases in DSB repair mechanisms. Golding et al. have reported a critical role for the RAF/MEK/ERK pathway for efficient homologous recombination and for radiation-induced ATM activation in glioma cells (46). The ERK pathway has also been shown to increase mRNA and protein expression of ERCC1 and XRCC NHEJ factors upon IR (46). In addition, MEK inhibitors, as well as AKT inhibitors, were found to block EGF-stimulated DSB repair through both HR and NHEJ, but the mechanism by which this inhibition occurs was not described in his study (46). A recent report has demonstrated that the catalytic subunit of DNA-PK, can interact with AKT upon IR and EGF stimulation, enhancing its auto-phosphorylation on Ser2056 and Thr2609 that is needed for efficient DSB repair (47).

Conversely, DNA-PK has been shown to behave as an AKT upstream kinase upon genotoxic stresses (48). However, we were unable to detect AKT activation in HSPCs in response to TPO and/or IR. This is to our knowledge the first evidence for an interaction between DNA-PKc and activated ERKs and for a direct role of this pathway in DNA-PK and NHEJ activation. Although further studies are required to determine how ERK kinases regulate DNA-PK activation upon IR, our results indicate that induction the early response and stress-inducible gene product *Iex-1* is specifically required for this effect in both human and mouse HSPCs. This was shown by the decreased interaction between DNA-PKc and pERK in *Iex-1*^{-/-} HSPCs. Moreover, TPO-mediated increased in DSB repair, NHEJ activity and DNA-PK phosphorylation upon IR were also severely affected by the absence or shRNA-mediated knockdown of *Iex-1*. We have previously shown that in addition to being an ERK phosphorylation target, IEX-1 acts as a scaffold protein for activated ERKs, bringing the phosphorylated kinases in complex with other proteins, such as PP2A, and enabling their phosphorylation (39). The IEX-1-FTF mutant form deleted in its pERK binding site could not rescue the DSB repair defect of *Iex-1*^{-/-} LSKs. Interestingly, overexpression of this mutant alters TPO-enhanced DNA-PK phosphorylation and the pERK/DNA-PK interaction, showing that IEX-1 is required to bring activated ERKs to DNA-PK and for DNA-PKc auto-phosphorylation on Ser2056. Thus, IEX-1 might increase DNA-PK activation by promoting its phosphorylation by ERKs upon IR. However, the numerous phosphorylation sites present in DNA-PKc and the paucity of HSPCs precludes us to test this hypothesis.

Nuclear translocation of RelA has also been observed in HSCs of aged mice (49). A recent study demonstrated that HSC selfrenewal and differentiation potentials are severely impaired in mice harboring a conditional deletion of the NF-κB RelA/p65 subunit. RelA^{-/-} HSPCs showed decreased expression of key factors involved in HSC maintenance and upregulation of lineage restricted genes (50). This indicates that NF-κB signaling is activated *in vivo* in normal adult HSCs but the stimulus responsible for this activation under homeostasis is unknown. A previous study had shown that TPO can activate NF-κB in megakaryocytes (51). Our results show that TPO also can induce NF-κB DNA binding activity in HSPCs. Although this activation is low it seems specific since no NF-κB DNA binding was detected in *Mpl*^{+/-} cells HSPCs despite of the presence of 4 others cytokines in the medium. In addition, although IR has only a slight effect by itself, TPO and IR act in synergy to stimulate NF-κB in WT but not in *Mpl*^{+/-} cells. The majority of the NF-κB DNA binding activity contain the RelA/p65 subunit, suggesting that loss of TPO signaling may participate to the RelA^{-/-} HSC phenotype in addition to its effect in the HSC DNA damage response.

NF-κB-induced expression of anti-apoptotic Bcl-2 family members plays an important role in the cell survival following DNA damage (52). Although NF-κB may regulate expression

of many target genes in HSPCs, our results show that in IEX-1 induction is sufficient to promote TPO-mediated effect on DNA damage repair, as exogenous IEX-1 expression is sufficient to rescue TPO responses of *lex-1*^{-/-} and *Mpl*^{-/-} cells. This is in agreement with our previous data showing that TPO-mediated decreased DNA damage and radio-sensitivity in HSPCs is unrelated to changes in apoptosis and results specifically from alteration in the DNA repair process. Horwitz and collaborators have found that megakaryocytes resist marrow radio-ablation and facilitate niche osteoblast expansion (53). TPO administration before TBI enhances this megakaryocyte function leading to promotion of HSC engraftment (54). The ERK pathway and IEX-1 induction play an important role in megakaryocytes as well. It is intriguing that the same signaling pathway involving IEX-1, NF-κB and ERK activation could be triggered by *Mpl*/TPO to protect both HSCs and megakaryocyte upon IR. Manipulation of one of these downstream actors may allow at the same time increased megakaryocyte function and niche reconstruction and limit thrombocytopenia and HSC long-term injury.

Interestingly *lex-1* is one of the most down-regulated genes in MDS (55, 56). Its expression is decreased in CD34⁺ cells of 60% of the patients with low-risk MDS and low expression levels are associated with short survival. *lex-1* down-regulation has been suggested to be linked to the high level of apoptosis observed in these patients. Our results showing that *lex-1*^{-/-} HSPCs show increased DNA damage even in the absence for IR suggest that decreased IEX-1 expression in low-risk MDS patients could lead to impaired repair through the classical DNA-PK-dependent NHEJ and accelerates MDS disease progression, in addition to predispose to radiotherapy-induced secondary MDS development. This is in agreement with the DNA instability found in low-risk MDS patients and MDS viewed as a defective DNA damage response disease (57, 58). In addition, decreased DNA repair through the classical NHEJ pathway and lower DNA-PK expression were found in a mouse model of MDS (59).

ACKNOWLEDGMENTS

We thank Richard Dyunga for technical assistance, the following Cochin Institute technical platforms: Animal facility, Cellular Imaging and Immunobiology, and the Proteomic Platform of Paris Descartes University (3P5). This work was supported by INSERM and by grants from Ligue Contre le Cancer, Comité d'Ile de France (RS12/75-67) and INCa Plan Cancer (A12162KS) to F.P. B.L. and D.B. are recipients of fellowships from ARC foundation and Ministère de l'Enseignement Supérieur et de la Recherche, respectively.

The authors declare no conflicting financial interests.

REFERENCES

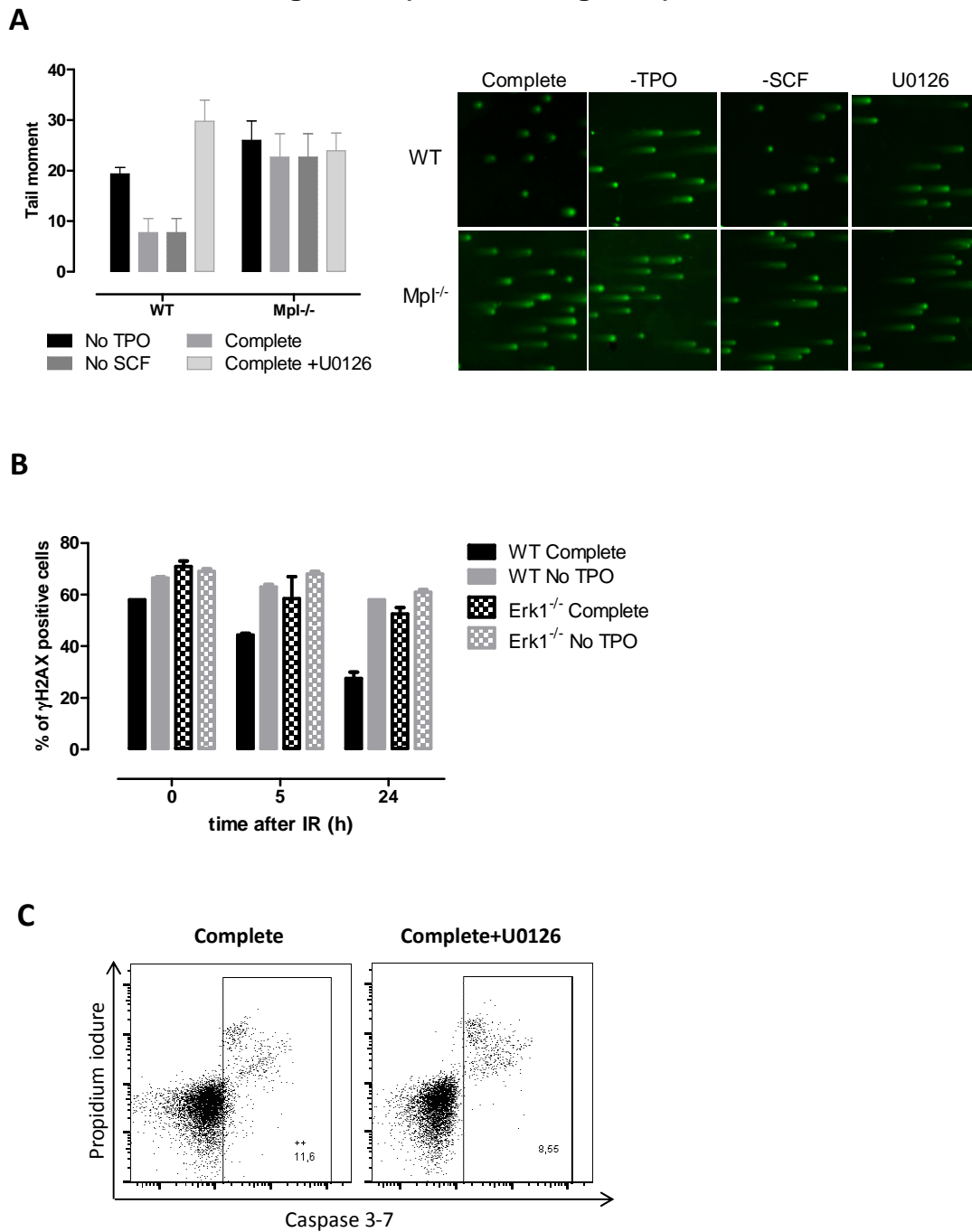
1. Simonnet AJ, Nehme J, Vaigot P, Barroca V, Leboulch P, Tronik-Le Roux D. Phenotypic and functional changes induced in hematopoietic stem/progenitor cells after gamma-ray radiation exposure. *Stem Cells*. 2009 Jun;27(6):1400-9.
2. Wang Y, Liu L, Pazhanisamy SK, Li H, Meng A, Zhou D. Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic Biol Med*. 2010 Jan 15;48(2):348-56.
3. Fleenor CJ, Marusyk A, DeGregori J. Ionizing radiation and hematopoietic malignancies: altering the adaptive landscape. *Cell Cycle*. 2010 Aug 1;9(15):3005-11.
4. Iliakis G, Wang H, Perrault AR, Boecker W, Rosidi B, Windhofer F, et al. Mechanisms of DNA double strand break repair and chromosome aberration formation. *Cytogenet Genome Res*. 2004;104(1-4):14-20.
5. Ferguson DO, Sekiguchi JM, Chang S, Frank KM, Gao Y, DePinho RA, et al. The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000 Jun 6;97(12):6630-3.
6. Weinstock DM, Brunet E, Jasin M. Formation of NHEJ-derived reciprocal chromosomal translocations does not require Ku70. *Nat Cell Biol*. 2007 Aug;9(8):978-81.
7. Mohrin M, Bourke E, Alexander D, Warr MR, Barry-Holson K, Le Beau MM, et al. Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell stem cell*. 2010 Aug 6;7(2):174-85.
8. Nijnik A, Woodbine L, Marchetti C, Dawson S, Lambe T, Liu C, et al. DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):686-90.
9. Rossi DJ, Bryder D, Seita J, Nussenzweig A, Hoeijmakers J, Weissman IL. Deficiencies in DNA damage repair limit the function of haematopoietic stem cells with age. *Nature*. 2007 Jun 7;447(7145):725-9.
10. de Laval B, Pawlikowska P, Petit-Cocault L, Bilhou-Nabera C, Aubin-Houzelstein G, Souyri M, et al. Thrombopoietin-increased DNA-PK-dependent DNA repair limits hematopoietic stem and progenitor cell mutagenesis in response to DNA damage. *Cell stem cell*. 2013 Jan 3;12(1):37-48.
11. Quian H, Buza-Vidas N, Hyland C, Jensen C, Antonchuck J, Mansson R, et al. Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell stem cell*. 2007;1:671-84.
12. Yoshihara H, Arai F, Hosokawa K, Hagiwara T, Tabuko K, Nakamura Y, et al. Thrombopoietin/Mpl signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell stem cell*. 2007;1:1-13.
13. Fox N, Priestley G, Papayannopoulou T, Kaushansky K. Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J Clin Invest*. 2002 Aug;110(3):389-94.
14. Pardanani AD, Levine RL, Lasho T, Pikman Y, Mesa RA, Wadleigh M, et al. MPL515 mutations in myeloproliferative and other myeloid disorders: a study of 1182 patients. *Blood*. 2006 Nov 15;108(10):3472-6.
15. Ikeda Y, Miyakawa Y. Development of thrombopoietin receptor agonists for clinical use. *J Thromb Haemost*. 2009 Jul;7 Suppl 1:239-44.
16. Du J, Wang J, Kong G, Jiang J, Zhang J, Liu Y, et al. Signaling profiling at the single-cell level identifies a distinct signaling signature in murine hematopoietic stem cells. *Stem cells (Dayton, Ohio)*. 2012 Jul;30(7):1447-54.
17. Kato Y, Iwama A, Tadokoro Y, Shimoda K, Minoguchi M, Akira S, et al. Selective activation of STAT5 unveils its role in stem cell self-renewal in normal and leukemic hematopoiesis. *J Exp Med*. 2005 Jul 4;202(1):169-79.
18. Seita J, Ema H, Ooehara J, Yamazaki S, Tadokoro Y, Yamasaki A, et al. Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007 Feb 13;104(7):2349-54.
19. Besancenot R, Chaligne R, Tonetti C, Pasquier F, Marty C, Lecluse Y, et al. A senescence-like cell-cycle arrest occurs during megakaryocytic maturation: implications for physiological and pathological megakaryocytic proliferation. *PLoS biology*. 2010;8(9).
20. Fichelson S, Freyssinier JM, Picard F, Fontenay-Roupie M, Guesnu M, Cherai M, et al. Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood*. 1999;94(5):1601-13.
21. Rojnuckarin P, Kaushansky K. Actin reorganization and proplatelet formation in murine megakaryocytes: the role of protein kinase alpha. *Blood*. 2001 Jan 1;97(1):154-61.
22. Rouyez MC, Boucheron C, Gisselbrecht S, Dusanter-Fourt I, Porteu F. Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol Cell Biol*. 1997;17(9):4991-5000.

23. Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneux C, Pezeron G, Porteu F. IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *Embo J*. 2002 Oct 1;21(19):5151-63.
24. Hamelin V, Letourneux C, Romeo PH, Porteu F, Gaudry M. Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood*. 2006 Apr 15;107(8):3106-13.
25. Wu MX. Roles of the stress-induced gene IEX-1 in regulation of cell death and oncogenesis. *Apoptosis*. 2003 Jan;8(1):11-8.
26. Arlt A, Minkenberg J, Kruse ML, Grohmann F, Folsch UR, Schafer H. Immediate early gene-X1 interferes with 26 S proteasome activity by attenuating expression of the 19 S proteasomal components S5a/Rpn10 and S1/Rpn2. *Biochem J*. 2007 Mar 1;402(2):367-75.
27. Arlt A, Rosenstiel P, Kruse ML, Grohmann F, Minkenberg J, Perkins ND, et al. IEX-1 directly interferes with RelA/p65 dependent transactivation and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta*. 2007 Dec 23.
28. Kumar R, Kobayashi T, Warner GM, Wu Y, Salisbury JL, Lingle W, et al. A novel immediate early response gene, IEX-1, is induced by ultraviolet radiation in human keratinocytes. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;253(2):336-41.
29. Kumar R, Lutz W, Frank E, Im HJ. Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004 Oct 29;323(4):1293-8.
30. Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, Wu MX. Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem*. 2006 Jun 2;281(22):15304-11.
31. Pawlikowska P, Leray I, de Laval B, Guihard S, Kumar R, Rosselli F, et al. ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response. *Cell Death Differ*. 2010 Nov;17(11):1739-50.
32. Agou F, Courtois G, Chiaravalli J, Baleux F, Coic YM, Traincard F, et al. Inhibition of NF-kappa B activation by peptides targeting NF-kappa B essential modulator (nemo) oligomerization. *J Biol Chem*. 2004 Dec 24;279(52):54248-57.
33. Petit-Cocault L, Volle-Challier C, Fleury M, Peault B, Souyri M. Dual role of Mpl receptor during the establishment of definitive hematopoiesis. *Development*. 2007 Aug;134(16):3031-40.
34. Saulnier N, Guihard S, Holy X, Decembre E, Jurdic P, Clay D, et al. ERK1 regulates the hematopoietic stem cell niches. *PLoS One*. 2012;7(1):e30788.
35. Sommer SL, Berndt TJ, Frank E, Patel JB, Redfield MM, Dong X, et al. Elevated blood pressure and cardiac hypertrophy after ablation of the gly96/IEX-1 gene. *J Appl Physiol*. 2006 Feb;100(2):707-16.
36. Seluanov A, Mittelman D, Pereira-Smith OM, Wilson JH, Gorbunova V. DNA end joining becomes less efficient and more error-prone during cellular senescence. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 May 18;101(20):7624-9.
37. Fan AC, Deb-Basu D, Orban MW, Gotlib JR, Natkunam Y, O'Neill R, et al. Nanofluidic proteomic assay for serial analysis of oncoprotein activation in clinical specimens. *Nat Med*. 2009 May;15(5):566-71.
38. Jacque E, Tchenio T, Piton G, Romeo PH, Baud V. RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2005 Oct 11;102(41):14635-40.
39. Letourneux C, Rocher G, Porteu F. B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *Embo J*. 2006 Feb 22;25(4):727-38.
40. Chan DW, Chen BP, Prithivirajasingh S, Kurimasa A, Story MD, Qin J, et al. Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev*. 2002 Sep 15;16(18):2333-8.
41. Chen BP, Chan DW, Kobayashi J, Burma S, Asaithamby A, Morotomi-Yano K, et al. Cell cycle dependence of DNA-dependent protein kinase phosphorylation in response to DNA double strand breaks. *J Biol Chem*. 2005 Apr 15;280(15):14709-15.
42. Hadian K, Krappmann D. Signals from the nucleus: activation of NF-kappaB by cytosolic ATM in the DNA damage response. *Science signaling*. 2011;4(156):pe2.
43. Tong W, Ibarra YM, Lodish HF. Signals emanating from the membrane proximal region of the thrombopoietin receptor (mpl) support hematopoietic stem cell self-renewal. *Exp Hematol*. 2007 Sep;35(9):1447-55.
44. Chan G, Gu S, Neel BG. Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood*. 2013 May 2;121(18):3594-8.
45. Wei F, Yan J, Tang D. Extracellular signal-regulated kinases modulate DNA damage response - a contributing factor to using MEK inhibitors in cancer therapy. *Current medicinal chemistry*. 2011;18(35):5476-82.
46. Golding SE, Rosenberg E, Neill S, Dent P, Povirk LF, Valerie K. Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1046-53.

47. Toulany M, Kehlbach R, Florczak U, Sak A, Wang S, Chen J, et al. Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Molecular cancer therapeutics*. 2008 Jul;7(7):1772-81.
48. Bozulic L, Surucu B, Hynx D, Hemmings BA. PKBalpha/Akt1 acts downstream of DNA-PK in the DNA double-strand break response and promotes survival. *Mol Cell*. 2008 Apr 25;30(2):203-13.
49. Chambers SM, Goodell MA. Hematopoietic stem cell aging: wrinkles in stem cell potential. *Stem cell reviews*. 2007 Fall;3(3):201-11.
50. Stein SJ, Baldwin AS. Deletion of the NF-kappaB subunit p65/RelA in the hematopoietic compartment leads to defects in hematopoietic stem cell function. *Blood*. 2013 Jun 20;121(25):5015-24.
51. Zhang Y, Sun S, Wang Z, Thompson A, Kaluzhny Y, Zimmet J, et al. Signaling by the Mpl receptor involves IKK and NF-kappaB. *Journal of cellular biochemistry*. 2002;85(3):523-35.
52. Roos WP, Kaina B. DNA damage-induced cell death: from specific DNA lesions to the DNA damage response and apoptosis. *Cancer Lett*. 2013 May 28;332(2):237-48.
53. Dominici M, Rasini V, Bussolari R, Chen X, Hofmann TJ, Spano C, et al. Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood*. 2009 Sep 10;114(11):2333-43.
54. Olson TS, Caselli A, Otsuru S, Hofmann TJ, Williams R, Paolucci P, et al. Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood*. 2013 Jun 27;121(26):5238-49.
55. Prall WC, Czibere A, Grall F, Spentzos D, Steidl U, Giagounidis AA, et al. Differential gene expression of bone marrow-derived CD34+ cells is associated with survival of patients suffering from myelodysplastic syndrome. *Int J Hematol*. 2009 Mar;89(2):173-87.
56. Steensma DP, Neiger JD, Porcher JC, Keats JJ, Bergsagel PL, Dennis TR, Knudson RA, Jenkins RB, Santana-Davila R, Kumar R, Ketterling RP. Rearrangements and amplification of IER3 (IEX-1) represent a novel and recurrent molecular abnormality in myelodysplastic syndromes. *Cancer Res*. 2009 Oct 1;69(19):7518-23. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-09-1428. Epub 2009 Sep 22.
57. Novotna B, Neuwirtova R, Siskova M, Bagryantseva Y. DNA instability in low-risk myelodysplastic syndromes: refractory anemia with or without ring sideroblasts. *Human molecular genetics*. 2008 Jul 15;17(14):2144-9.
58. Zhou T, Hasty P, Walter CA, Bishop AJ, Scott LM, Rebel VI. Myelodysplastic syndrome: An inability to appropriately respond to damaged DNA? *Experimental hematology*. 2013 Apr 30.
59. Puthiyaveetil AG, Reilly CM, Pardee TS, Caudell DL. Non-homologous end joining mediated DNA repair is impaired in the NUP98-HOXD13 mouse model for myelodysplastic syndrome. *Leukemia research*. 2013 Jan;37(1):112-6.

SUPPLEMENTARY FIGURES

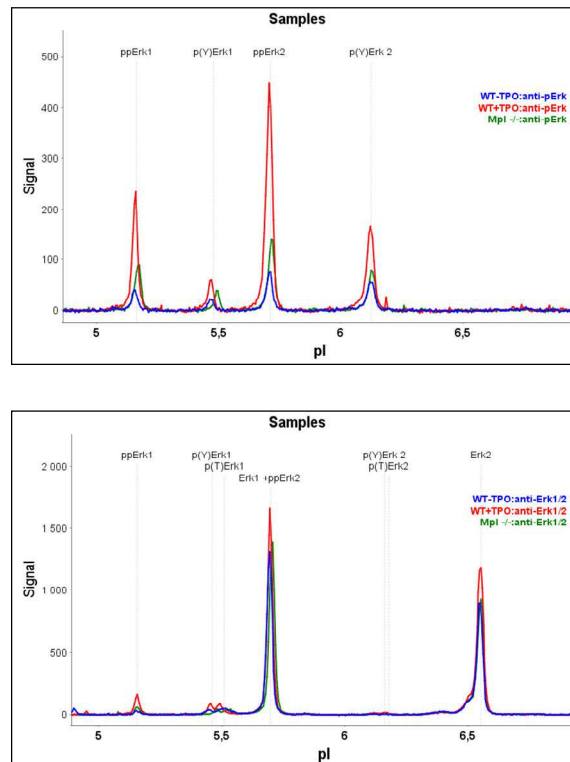
Figure S1 (related to Figure 1)



ERK activation is required for TPO-induced DSB repair in HSPCs

(A) Comet tail moment analysis in WT and *Mpl*^{-/-} 2h after IR (2 Gy) *in vitro* of HSPCs cultured in medium without TPO or SCF or in complete medium containing or not 10 μ M U0126 and 2h after IR (2 Gy). (B) Kinetics of γ H2AX foci disappearance in WT and *Erk1*^{-/-} progenitor cells cultured in complete medium or medium without TPO and IR (2Gy) *in vitro*. (C) Activated Fam caspase 3-7 and propidium iodide staining in LSK cells 24h after IR and cultured in complete medium with or without U0126.

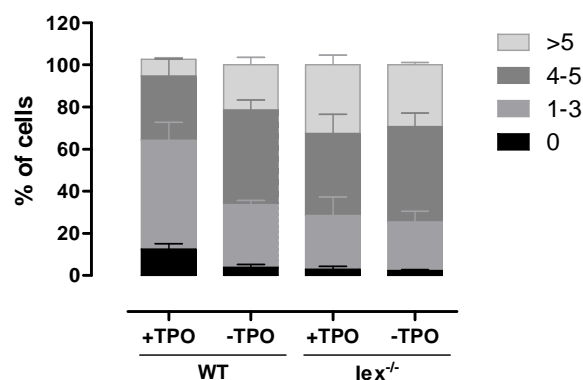
Figure S2 (related to Figure 2)



TPO is the major activator of ERK1/2 phosphorylation in HSPCs.

Representative profiles of capillary isoelectric focusing immunoassays with anti-pERK and anti-ERK antibodies performed with WT LSK cells cultured in complete medium or in medium without TPO and Mpl^{-/-} cells cultured in complete medium.

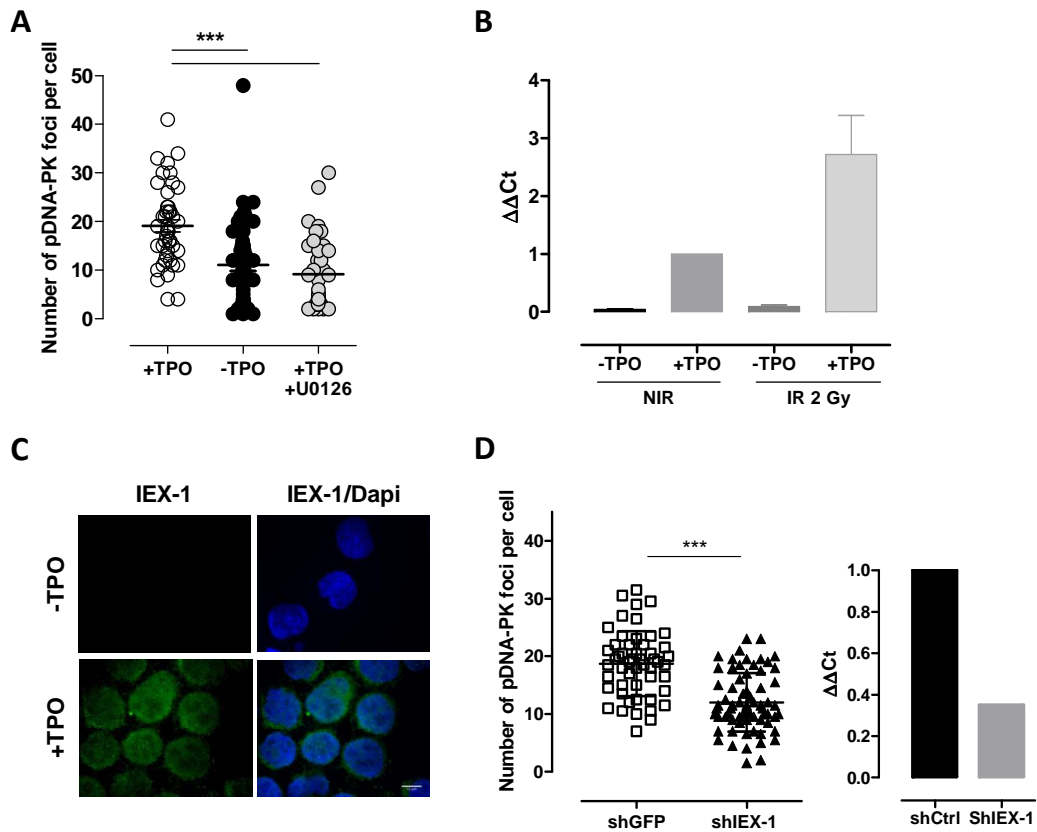
Figure S3 (related to Figure 3)



IEX-1 is required for TPO-mediated DNA repair.

gammaH2AX foci number repartition in WT and lex^{-/-} LSK cells cultured in complete medium or without TPO, 24h after IR (Means + SEM, n=3).

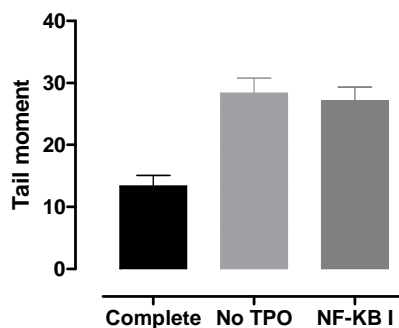
Figure S4 (related to Figure 6)



ERK activation and IEX-1 induction are required for TPO-mediated DNA-PK activation in human UT7-Mpl cells.

(A) Number of Thr2609-pDNA-PK 30 min after IR of UT7-Mpl cultured with or without TPO and U0126. (B, C) IEX-1 expression analysis using (B) Q-PCR and (C) immunofluorescence staining, in UT7-Mpl cells cultured with or without TPO and 1h after IR or not. (D) Left: number of Thr2609-pDNA-PK 30 min after irradiation of UT7-Mpl infected with shRNA control or against IEX-1 cultured with TPO. Right: Transcriptional analysis of IEX-1. Representative experiment out of 3 similar performed

Figure S5 (related to Figure 7)



NF-κB activity is necessary for TPO promotion of DSB repair after IR

Tail moment analysis of WT LSK cultured in medium without TPO or in complete medium containing or not NF-κB inhibitor (NF-κB I) and 2h after IR (2 Gy). Results are means + SEM of the comet moment tail values from a representative experiment measured in at least 60 cells per condition.

Discussion

Perspectives

I. Rôle de la TPO dans la réparation de l'ADN des CSH

Les CSH sont un pool de cellules importantes dans l'hématopoïèse car elles sont à l'origine de toutes les cellules de la moelle osseuse et du sang. Le maintien de l'intégrité génomique des CSH est nécessaire pour éviter la propagation d'erreurs et la transformation leucémique. La CSH a acquis des mécanismes qui permettent de limiter les cassures doubles brins endogènes. Ainsi, l'environnement hypoxique de la cellule limite la production de ROS, inducteurs de cassures de l'ADN, et le statut quiescent de la cellule empêche les erreurs de réplication de l'ADN. Cependant, les mécanismes utilisés par la CSH pour réparer les dommages de l'ADN sont peu connus. Comme présenté dans l'introduction, un déficit d'une des protéines de la réponse aux dommages de l'ADN induit une perte précoce des CSH. Ces voies sont donc nécessaires au maintien des CSH. Une étude récente a montré qu'après irradiation les mécanismes de l'apoptose sont inhibés dans les CSH murines afin de favoriser la réparation de l'ADN ce qui évite une perte du pool de CSH. Cependant, du fait de son statut quiescent, la CSH ne peut utiliser que la voie NHEJ pour réparer les cassures de l'ADN (Mohrin et al., 2010). Cette voie de réparation est considérée comme mutagène car elle induit des mutations autour du site de cassure.

Les CSH sont donc des cibles majeures de carcinogenèse induite par radio ou chimiothérapie. En effet 3 à 10% des patients traités pour des cancers et notamment le cancer du sein, développent des leucémies selon la dose et le type de traitement utilisé. Ces données montrent l'importance d'étudier et d'améliorer la réponse des CSH aux dommages de l'ADN.

A. La TPO induit une radiorésistance des CSH

Nous avons observé une radiosensibilité des souris $Mpl^{-/-}$ ainsi que de leurs CSH par rapport à des sauvages. La radiosensibilité observée lors de tests clonogéniques peut être due à un défaut de réparation, une apoptose précoce ou à une senescence des cellules pour éviter la propagation de défauts génétiques. Une étude précédente avait montré que l'injection de TPO dans des souris, juste avant ou après un

traitement myélo-suppressif par une irradiation sublétales combinée à la carboplatine permet une amélioration du recouvrement de la moelle osseuse dans les souris sauvages mais pas dans les souris déficientes pour p53 dans les progéniteurs. Les auteurs de cette étude montrent que la TPO induit l'inhibition des mécanismes d'apoptose dépendants de p53 (Pestina et al., 2001). Le rôle de la TPO sur les CSH après traitement génotoxique n'avait jamais été étudié avant ma thèse. Dans notre étude nous n'avons pas vu d'effet de la TPO sur l'apoptose des CSH dans les différentes conditions expérimentales testées *in vitro* et *in vivo* à différents temps après irradiation de 2 Gy. De plus, la TPO n'augmente pas les gènes pro-apoptotiques dépendants de p53. Ainsi la TPO n'agit pas sur l'apoptose précoce pour protéger les CSH contre les dommages de l'ADN. Ces résultats montrent que la TPO agit différemment sur les CSH et sur les progéniteurs en réponse à l'irradiation.

Des études réalisées sur les LSK montrent une augmentation de leur sénescence due à une augmentation des ROS après irradiation des souris à 6 Gy (Wang et al., 2010). p38 est une MAPK induite en réponse à des cytokines mais également à des stress induisant des cassures de l'ADN comme les UV, les ROS et l'irradiation. Dans ce dernier cas, p38 induit la sénescence des cellules en induisant p19 et p16. Dans les CSH, l'augmentation des ROS induit une activation de p38 et une sénescence qui conduit à un défaut de leur auto-renouvellement et de leur maintenance (Ito et al., 2006) (Shao et al., 2011). Un traitement par des antioxydants ou des inhibiteurs de p38 restaure une fonction normale de ces CSH (Ito et al., 2006). Nous avons regardé si la TPO agit sur la sénescence ou la production de ROS. Nous n'avons pas observé d'effet de la TPO sur le marqueur de sénescence β -galactosidase, sur la production de ROS ou sur l'induction de p16 et p19. L'ajout d'inhibiteurs de p38 dans le milieu complet comprenant de la TPO ne modifie pas la cinétique de réparation observée en présence de TPO. De même, l'ajout de l'antioxydant N-Acéthyl-Cystéine (NAC) dans un milieu sans TPO n'améliore pas la réparation des CSH. Ces différentes données montrent que la TPO n'agit pas sur la sénescence ou la production des ROS.

Une des caractéristiques des CSH est d'être en quiescence, ce qui d'une part les protège contre les agents antiprolifératifs et d'autre part leur confère une

radiorésistance si elles sont comparées aux progéniteurs. La TPO est l'un des facteurs qui permet le maintien en quiescence des CSH dans la niche (Yoshihara et al., 2007). L'équipe de Suda a montré qu'une injection de TPO entraîne une augmentation de la quiescence des CSH. Ceci nous a laissé supposer que la TPO pourrait agir sur le cycle cellulaire des CSH pour améliorer leur radiorésistance. Nos expériences de marquage des CSH avec du CFSE n'ont montré aucun effet de la TPO sur leur prolifération après irradiation. De plus, en utilisant un marquage avec du BrdU et du Hoechst, nous n'avons pas observé d'arrêt en G2/M ou G1/S des LSK. Des marquages pyronine Y/Hoechst sur des CSH de souris irradiées ayant reçu une injection de TPO ou de PBS, ne montrent aucun effet de la cytokine sur l'entrée ou la sortie en G0. La différence entre nos résultats et ceux obtenus par l'équipe de Suda est la dose de TPO injectée qui est dix fois plus importante dans leurs expériences. D'autre part, nous travaillons dans un système irradié.

Ces résultats indiquent que la radiorésistance des CSH observée en présence de TPO dans les cellules sauvages quand elles sont comparée aux cellules $Mpl^{-/-}$, n'est pas due à un effet de la cytokine sur la réponse aux dommages de l'ADN suggérant qu'elle agit spécifiquement sur les voies de réparation. En effet, nous avons montré que la TPO est nécessaire au maintien de l'intégrité génomique de la CSH. La perte du récepteur Mpl entraîne un défaut de réparation et une instabilité génomique importante après irradiation. De plus, l'injection de TPO ou de son agoniste Romiplostim dans des souris sauvages protège les CSH d'une mutagenèse et d'une perte de fonction associées à l'irradiation. La TPO semble spécifique dans ce rôle puisque d'autres cytokines comme le SCF et Flt3-L, testées *in vitro* et *in vivo*, n'améliorent pas la réparation des CSH.

B. Rôle de la TPO sur la voie NHEJ

L'action de la TPO sur la réparation de l'ADN a été observée uniquement sur des cassures double brins. En effet, la mesure des cassures simple brin par des expériences de comètes en condition basique à temps précoce après irradiation, ne montre pas d'effet de la TPO sur leur réparation. Deux voies majeures sont utilisées pour réparer les cassures double brins : la voie de la recombinaison homologue et la

voie de la NHEJ. Nous avons testé l'action de la TPO sur la voie de la recombinaison homologue en analysant par immunofluorescence la cinétique de formation de foci Rad51 et celle-ci n'est pas modifiée en présence de TPO. De plus, la TPO ne permet pas la réparation de cassures double brins induites par des inhibiteurs de la réplication comme l'hydroxyurée ou la camptothécine qui sont généralement réparées par la voie de la recombinaison homologue puisque ces drogues bloquent les cellules en phase S. La TPO a un effet sur la réparation de l'ADN de différents types de cellules, les LSK-CD34⁺, les LSK, les Lin⁻ et les UT7-Mpl bien que les proportions en G0/G1/S soient différentes. Seule la voie NHEJ peut être utilisée dans toutes les phases du cycle. Ces résultats suggèrent que la TPO n'a pas d'effet sur la voie de la recombinaison homologue.

Nous avons montré que la TPO améliore la réparation de l'ADN des CSH lors de stress génotoxiques en agissant directement sur la voie NHEJ. L'inhibition de la DNA-PK empêche totalement la résolution des foci γ H2AX observée en présence de TPO. De plus l'injection de TPO dans des souris SCID déficientes pour DNA-PK, n'a pas d'effet bénéfique sur la réparation de l'ADN des CSH. Lors d'une cassure double brins, la DNA-PK se fixe au niveau des extrémités d'ADN libres et forme des foci visibles par microscopie, elle est ensuite activée par autophosphorylation sur les sites serine 2056 et thréonine 2609. Ces sites sont donc des marqueurs de l'activité de DNA-PK. La mutation de ces deux sites en alanine induit une diminution de la voie NHEJ (Chan et al., 2002). Nous avons mesuré l'activation de DNA-PK par immunofluorescence dans les cellules humaines CD34⁺CD38⁻ et dans la lignée UT7-Mpl, en comptant le nombre de foci phospho-Ser2056 ou phospho-Thr2609 par cellule. Cette technique nous a permis de montrer que le nombre de foci phospho-DNA-PK est augmenté en présence de TPO. Ces résultats sont confirmés par l'utilisation de substrats (présentés dans la Figure 5A et 5B de l'Article 1) sous forme plasmidique dans les progéniteurs hématopoïétiques murins ou intégrés dans le génome dans les cellules UT7-Mpl et qui mesurent spécifiquement l'activité NHEJ.

La voie NHEJ est considérée comme mutagène. En effet, les radiations ionisantes induisent des dommages sur les bases et sur les sucres et une lyse des extrémités des brins d'ADN est souvent nécessaire pour permettre à la ligase de lier les deux

brins. Ainsi, la présence de mutations autour du site de cassure est une caractéristique de la réparation par la voie NHEJ. C'est un mécanisme rapide qui permet la liaison directe des brins d'ADN. En effet, la plupart des cassures de l'ADN sont réparées par la NHEJ dans les 2h qui suivent le traitement (Goodarzi et al., 2010). Les extrémités des brins libres restent proches dans l'espace et dans le temps. Plus la réparation est lente, plus il est probable que ces extrémités interagissent ensemble et que des translocations se forment. Ainsi, une modification de la cinétique de réparation peut améliorer le niveau de réparation ou au contraire induire une instabilité génomique. La DNA-PK forme rapidement un pont entre les extrémités libres de l'ADN ce qui évite l'échange de brin et elle bloque également l'accès aux protéines de résection qui conduisent à la réparation par microhomologies et par Alt-NHEJ.

Nos résultats de comètes montrent qu'en absence de DNA-PK, il n'y a pas de réparation augmentée en présence de TPO, ce qui suggère que la TPO utilise une voie dépendante de DNA-PK pour réparer les cassures de l'ADN. En absence de TPO, l'analyse des événements de réparation montre une cinétique beaucoup plus lente et indépendante de DNA-PK car l'inhibition de la DNA-PK n'empêche pas cette réparation (Article 1, Figure 4C). La voie Alt-NHEJ est indépendante de la DNA-PK et nécessite la présence de microhomologies dans la région du site de cassure. Pour vérifier l'utilisation de la voie Alt-NHEJ en absence de TPO, nous avons utilisé le plasmide substrat présenté dans la Figure 5A de l'Article 1, transfecté dans des cellules UT7-Mpl. D'une part nous montrons que la TPO augmente la capacité de liaison par NHEJ dans ce système. D'autre part en séquençant les extrémités des cassures, nous avons observé qu'en présence de TPO, le nombre de séquences parfaitement réparées est plus élevé. Nous pouvons également observer une apparition de grandes délétions (supérieures à 100 paires de base) en absence de TPO. La présence de microhomologies est observée sur 15% et 44% des séquences en présence ou en absence de TPO, respectivement (Annexe 2 Figure 1). Ces résultats suggèrent que la Alt-NHEJ est augmentée en absence de TPO.

Mohrin et al. montrent que les CSH du fait de leur quiescence, n'utilisent que la voie NHEJ et que cette voie induit une instabilité génomique dans ces cellules (Mohrin et al., 2010). Nous confirmons l'utilisation de la NHEJ dans les CSH et qu'il existe une instabilité génomique transmissible à la descendance après irradiation des CSH sauvages. Dans notre étude nous montrons que la TPO améliore la réparation de l'ADN des CSH en augmentant l'efficacité et la fidélité de la voie NHEJ. La TPO augmente la cinétique de réparation de l'ADN et active plus fortement la DNA-PK ce qui favorise d'une part la NHEJ et d'autre part empêche l'utilisation de la voie Alt-NHEJ qui est fortement mutagène. Il serait intéressant de regarder l'effet de la TPO sur les protéines de la voie Alt-NHEJ et notamment sur PARP1 qui est l'initiateur de cette voie (Audebert et al., 2004). Une étude récente a montré que l'inhibition de PARP1 dans une lignée de fibroblastes humains diminue le nombre de translocations chromosomiques induites par l'irradiation ou l'étoposide (Wray et al., 2013).

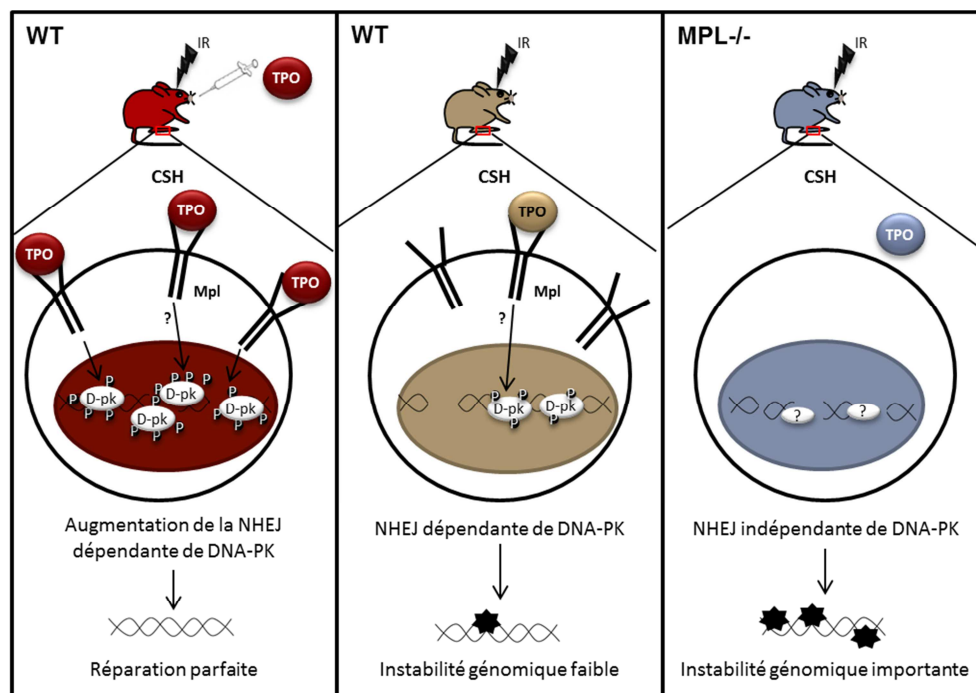


Figure 39 : Schéma de l'impact de la TPO sur la réparation de l'ADN des CSH

Nos résultats suggèrent que le rôle de la TPO est de guider la réparation vers la NHEJ classique qui est dépendante de DNA-PK en augmentant l'activation de cette protéine et en améliorant l'efficacité et la fidélité de la réparation. C'est la

première démonstration qu'un facteur de la niche impliqué dans la maintenance des CSH peut également réguler la réponse de ces cellules aux dommages de l'ADN en contrôlant directement les mécanismes de réparation. Il serait intéressant de regarder si la production de TPO par les ostéoblastes dans la moelle osseuse augmente après irradiation.

C. Intérêt d'une injection TPO avant thérapie

Deux agonistes de la TPO sont actuellement sur le marché, la Romiplostim et l'Eltrombopag. Ces deux molécules permettent l'activation de Mpl et des voies de signalisation en aval sans interférer avec la TPO endogène. L'administration de TPO chez les individus induit des réactions immunogènes et la production d'anticorps anti-TPO qui peuvent induire une thrombocytopénie. Nous avons montré que la Romiplostim a le même effet que la TPO sur la réparation de l'ADN des CSH *in vivo*. Ainsi, l'utilisation de la Romiplostim semble possible pour la protection des CSH de patients lors de traitements génotoxiques. Nous n'avons pas pu tester l'effet de l'Eltrombopag qui n'est pas fonctionnel sur les cellules de souris. Des injections répétées de forte dose de TPO ou de ses agonistes peuvent induire des complications comme des thromboses et des fibroses transitoires de la moelle osseuse. Dans notre système, une seule dose faible de TPO suffit pour éviter la mutagenèse à long terme des CSH. Le traitement par la TPO pourrait donc être utilisé pour protéger les CSH tout en évitant le développement de myélofibrose.

L'un des facteurs de croissance utilisé en clinique pour mobiliser les cellules de la moelle après un traitement radio- ou chimio-thérapeutiques est le G-CSF. Ce dernier permet la prolifération granulocytaire, évitant ainsi une neutropénie. Mohrin et al. ont montré que les CSH mobilisées *in vitro* par du G-CSF ou de la cyclophosphamide gardent les propriétés des CSH en inhibant les mécanismes de l'apoptose. En devenant proliférantes, elles acquièrent la possibilité d'utiliser la voie de la recombinaison homologue (Mohrin et al., 2010). Cependant, il a été montré que ces traitements et notamment le G-CSF induisent une perte de fonction des CSH et un biais de différenciation myéloïde (Wang et al., 2012) (Van Os et al., 2000). Les CSH de souris qui ont reçu une dose de TPO avant d'être irradiées, ont premièrement

moins de cassures chromosomiques et deuxième ont gardé leur capacité à reconstituer la moelle osseuse d'hôtes secondaires irradiés de façon létale. Ainsi, l'injection de TPO avant des thérapies utilisant des agents génotoxiques, pourrait servir d'une part à diminuer l'apparition de leucémies et de myélodysplasies secondaires en agissant sur l'intégrité génomique des CSH, et d'autre part à éviter la perte de fonction à long terme des CSH et la pancytopenie de la moelle osseuse qui pourrait en découler. De plus, la TPO permet l'augmentation du nombre de plaquettes mais aussi la prolifération de tous les progéniteurs de la moelle osseuse (Pestina et al., 2001) (Mouthon et al., 2002).

Les mégacaryocytes sont des cellules radorésistantes qui survivent plusieurs jours après une irradiation. En réponse à l'irradiation des souris, les mégacaryocytes qui normalement se trouvent dans le centre de l'os migrent dans la niche endostéale où ils permettent son remodelage en induisant la prolifération des ostéoblastes (Dominici et al., 2009). Cette migration dépend de la signalisation TPO/Mpl qui va induire, après irradiation, la sécrétion du facteur de croissance PDGF-BB par les mégacaryocytes, nécessaire à l'ostéogénèse. Les auteurs de cette étude montrent que l'injection de TPO au moment du traitement par irradiation améliore la fonction des mégacaryocytes, la reconstruction de la niche et la prise de greffe des CSH (Olson et al., 2013).

Ainsi, l'injection de TPO permet l'amplification des progéniteurs de la moelle osseuse, le maintien de l'intégrité génomique des CSH et une restauration de la niche endostéale après irradiation. Ces deux dernières propriétés permettent une meilleure reconstitution des CSH et finalement une amélioration de la récupération de l'hématopoïèse après traitements radio-thérapeutiques.

D. Importance du timing

Nos résultats montrent que la TPO protège les CSH uniquement si elle est administrée avant irradiation. Les cellules irradiées en absence de TPO sont

irréversiblement endommagées même lorsque la TPO est réintroduite après (Article 1 Figure S5 et Article 2 Figure 3E). Nous avons évalué la cinétique d'action de la TPO *in vitro*. L'ajout de TPO au moins trente minutes avant irradiation est suffisant pour protéger les CSH. En accord avec la vitesse de la mise en place des complexes DNA-PK et de la NHEJ, la TPO a une action rapide. En effet, la présence de TPO pendant l'heure qui suit l'irradiation est suffisante pour induire la réparation de l'ADN qu'elle soit ou non retirée par la suite.

Cette pré-incubation nécessaire avec la TPO permet sans doute à la cytokine d'activer les voies de signalisation en aval du récepteur afin de réaliser un « priming » pour augmenter la réparation de l'ADN des CSH en réponse à l'irradiation.

II. Les voies de signalisation en aval du récepteur Mpl

A. ERK

Les voies de signalisation, MAPK, Akt et STAT sont importantes dans la différenciation, la survie et la prolifération en réponse à la TPO. Cependant, peu de choses sont connues sur l'utilisation spécifique des voies de signalisation induites par la TPO dans les CSH et leur rôle en réponse à un stress génotoxique. Les données viennent surtout de l'étude des mégacaryocytes ou des lignées cellulaires. Dans une première approche de la signalisation induite par la TPO pour permettre la réparation de l'ADN, nous avons étudié l'importance de la voie ERK, une voie indispensable à la mégacaryopoïèse, dans la réparation de l'ADN des CSH en utilisant l'inhibiteur des MEK U0126. L'absence ou la diminution d'activation de ERK entraînent l'accumulation de cellules positives pour γ H2AX et la présence de cassures double brins mesurées par un test de comètes. Nous avons montré que pERK interagit avec la DNA-PK pour l'activer. L'activation de ERK en réponse à l'irradiation limite la perte de fonction des CSH induite par l'irradiation.

Si de nombreuses études ont rapporté l'influence de la voie de signalisation MAPK sur la réponse aux dommages de l'ADN, l'apoptose ou l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M, peu d'études ont décrit son rôle ou celui des facteurs de croissance en général sur les mécanismes de réparation.

Plusieurs études ont décrit un rôle de l'EGF-R (Epidermal Growth Factor Receptor) dans la réparation de l'ADN. Il a été observé une augmentation de la réparation des cassures double brins en réponse à son ligand, l'EGF (Kriegs et al., 2010). Différentes études ont montré qu'il agit d'une part sur la voie de la RH (Huang et al., 2008) mais aussi sur la NHEJ (Golding et al., 2009). EGF-R interagit directement avec DNA-PK (Bandyopadhyay et al., 1998). En réponse à un stress génotoxique, EGF-R migre dans le noyau. Ainsi, l'inhibition du récepteur induit une séquestration de DNA-PK dans le cytoplasme (Yacoub et al., 2001). Finalement, il a été observé une augmentation de la phosphorylation de DNA-PK sur sa thréonine 2609 en réponse à l'EGF (Javvadi et al., 2012) (Dittmann et al., 2005). Une étude de cellules de gliomes a également montré une augmentation des voies ERK et Akt en réponse à l'irradiation dans ces cellules. Lors d'une stimulation par l'EGF, l'inhibition des MAPK induit une diminution de la voie RH (Golding et al., 2007). L'irradiation induit une augmentation de l'ARNm et des protéines de la voie NHEJ, ERCC1 et XRCC. Cette augmentation est diminuée en présence de l'inhibiteur des MEK, PD98059 (Yacoub et al., 2003). Ces études montrent un rôle important des MAPK dans la régulation des enzymes des voies de réparation, en réponse à l'EGF.

Nos résultats sont les premiers à mettre en évidence une interaction entre pERK et la DNA-PK nécessaire à l'activation de la DNA-PK et de la voie NHEJ. La TPO est l'activateur majeur des ERK dans les mégacaryocytes. Dans cette étude, nous montrons qu'elle est également l'activateur principal de la voie ERK dans les CSH. Nous avons montré que les CSH des souris *Erk1^{-/-}* ont un défaut de réparation de l'ADN mais des études de transplantation dans des souris irradiées de façon létale ont montré que les CSH de souris *Erk1^{-/-}* ont une capacité de reconstitution de la moelle osseuse semblables aux CSH de souris sauvages (Saulnier et al., 2012). Une étude utilisant des souris déficientes pour ERK1 et ERK2 dans les cellules hématopoïétiques, montre une diminution du nombre des CSH due à une diminution de leur survie et de leur prolifération (Chan et al., 2013). Cependant, dans notre étude, nous montrons que l'inhibition des ERK par le U0126 n'affecte pas la capacité

de reconstitution des LSK. La différence entre ces deux études peut être due à une inhibition transitoire des ERK par l'utilisation d'un inhibiteur dans nos expériences (inhibition pendant 2h avant l'injection). L'effet de la TPO sur la réparation est très rapide et donc une courte inhibition des ERK est suffisante pour induire un défaut de reconstitution des LSK après irradiation. Cependant, l'inhibition de ERK n'est peut-être pas maintenue et suffisante pour induire un défaut de reconstitution.

Nous n'avons pas pu observer d'activation d'Akt par la TPO dans les CSH. Il a cependant été montré qu'en réponse aux irradiations ou à l'EGF, Akt interagit avec DNA-PK. La formation de ce complexe est d'une part importante pour le recrutement de DNA-PK sur le site de cassure et d'autre part pour l'auto-phosphorylation de DNA-PK sur ses sites Ser2056 et Thr2609 (Toulany et al., 2008) (Toulany et al., 2012). Akt pourrait donc jouer un rôle dans l'activation de la DNA-PK dans les CSH et nous sommes en train d'évaluer cette possibilité en utilisant des inhibiteurs spécifiques.

B. NF- κ B

La voie de signalisation NF- κ B (Nuclear Factor kappa B) est impliquée dans de nombreux processus cellulaires, tels que la réponse immune, l'inflammation, la croissance cellulaire ou encore l'apoptose. Elle peut être induite par autant de stimuli différents : virus, bactéries, stress physiques ou oxydatifs, ... (Gilmore, 2006). Les sous unités p50, p52, p65 (RelA), RelB et c-Rel forment des hétéro- ou homo-dimères pour former le complexe NF- κ B. Dans le cytoplasme, le complexe NF- κ B est inactivé par son interaction avec la protéine I κ B qui masque son site d'export nucléaire. En réponse à un stimulus, le complexe IKK (composé de IKK α , IKK β et Nemo) phosphoryle I κ B menant à sa dégradation et permettant la libération du complexe NF- κ B. Ce dernier migre dans le noyau où il va induire la transcription de gènes cibles (Figure 40). Le processus d'activation par NF- κ B est transitoire car certains des gènes cibles sont des inhibiteurs du complexe.

Nos résultats d'EMSA réalisés sur des LSK montrent que la TPO et l'irradiation peuvent augmenter l'activation de NF- κ B dans ces cellules. Une étude a montré que

la TPO peut activer la voie NF- κ B dans les mégacaryocytes (Zhang et al., 2002). Notre étude est la première à montrer l'activation de NF- κ B par la TPO dans les CSH.

La voie d'activation conduisant à l'activation de NF- κ B par l'irradiation n'est pas encore totalement élucidée. Deux grandes voies ont été décrites. La première est dépendante de la protéine ATM qui est activée lors d'un dommage de l'ADN. Elle peut alors phosphoryler et interagir avec Nemo dans le noyau. Le complexe migre alors dans le cytoplasme où il active IKK. Le complexe NF- κ B passe dans le noyau où il induit l'expression des gènes de survie, de la réparation, de l'arrêt du cycle cellulaire ou de la sénescence (Figure 40) (Hadian and Krappmann, 2011). La deuxième voie met en jeu IKK ϵ . Lors d'un dommage de l'ADN, IKK ϵ est SUMOylé et transloque dans le noyau. Après une étape de phosphorylation, il active la sous unité p65 du complexe NF- κ B qui va permettre une réponse anti-apoptotique (Renner et al., 2010).

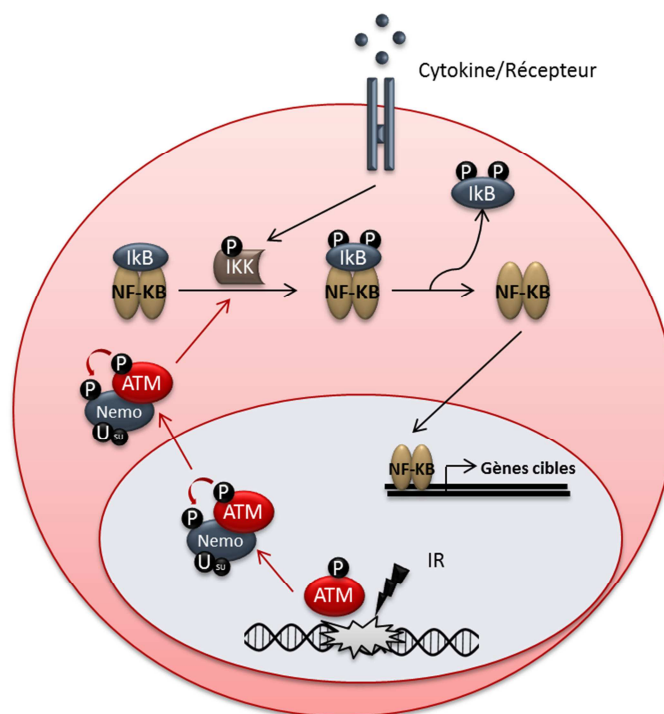


Figure 40 : Schéma de la voie NF- κ B classique et de la voie dépendante d'ATM

La voie NF- κ B est activée en réponse à différents stress et cytokines. La première étape est l'activation par phosphorylation de IKK qui va phosphoryler et dégrader l'inhibiteur du complexe NF- κ B, I κ B. Le complexe NF- κ B passe alors dans le noyau, où il agit comme un facteur de transcription de ses gènes cibles.

Nos résultats de comètes et de marquage γ H2AX montrent que l'activation de NF- κ B est nécessaire pour améliorer la réparation de l'ADN et sans doute pour augmenter l'activation de la DNA-PK via l'induction de IEX-1. Nous avons observé un défaut de réparation des CSH par la TPO en présence d'un inhibiteur d'ATM, ce qui suggère l'importance d'ATM dans notre système. De plus, la réparation de l'ADN induite par la TPO nécessite l'induction de IEX-1, qui est exprimé de façon dépendante d'ATM dans les cellules HeLa (Pawlikowska et al., 2010). De façon intéressante, et concordant avec nos résultats sur la réparation des dommages de l'ADN en présence de TPO, l'activation de la voie NF- κ B dépendante d'ATM est possible uniquement après l'induction de cassure double brins (Habraken and Piette, 2006). Cependant, la cinétique d'activation de NF- κ B par les cassures double brins et la voie ATM/Némo est lente, il faut plus d'une heure pour que le complexe Nemo/ATM passe dans le cytoplasme pour activer IKK (Habraken and Piette, 2006). Ces données divergent de nos résultats où l'activation de NF- κ B lors d'une stimulation TPO et l'irradiation est rapide et visible 30 min après traitement. De plus, des expériences d'immunofluorescence pour visualiser les foci p-ATM en réponse aux irradiations dans des LSK n'ont pas montré d'effet de la TPO sur cette activation.

Ces différents résultats montrent qu'ATM est nécessaire mais suggèrent qu'une autre voie est impliquée dans l'activation de NF- κ B en réponse à la TPO et à l'irradiation.

Des expériences supplémentaires sont nécessaires pour déterminer comment la TPO augmente l'activation de NF- κ B en réponse à l'irradiation et si le résultat que l'on observe est dû à une synergie ou à une additivité de la TPO et de l'irradiation. De plus, il serait intéressant de déterminer à quel niveau la TPO agit sur cette voie. Dans le cas d'une activation par l'IL2, la voie PI3K/Akt permet cette activation (Chan et al., 2010). Il serait également intéressant de déterminer si NF- κ B est induit en réponse à l'irradiation par la voie IKK ϵ .

La voie NF- κ B est connue pour avoir un rôle dans la différenciation des progéniteurs lymphoïdes et myéloïdes (Mankan et al., 2011) (Gerondakis et al., 2012). Cependant peu d'études ont regardé l'implication de cette voie dans les CSH. La délétion de la

protéine RelB induit une perte d'auto-renouvellement dû à un défaut de maintien des CSH dans la niche (Zhao et al., 2012). Les souris *RelA*^{-/-} ne sont pas viables. La transplantation de cellules de foie fœtal de ces souris montre une prise de greffe normale (Alcamo et al., 2002). Les cellules de foie fœtal ayant une double délétion de *RelA* et *c-Rel* ont un défaut de reconstitution à court terme (Grossmann et al., 1999). Une étude très récente montre qu'une déficience de *RelA* dans le système hématopoïétique de souris induit une diminution de l'auto-renouvellement et la différenciation des CSH. Dans cette étude, les auteurs montrent que la voie NF- κ B est nécessaire à l'expression de facteurs de maintien des CSH (Stein and Baldwin, 2013). Ainsi, il semble que la voie NF- κ B est nécessaire au maintien des CSH. La TPO activant NF- κ B faiblement en absence d'irradiation, il serait intéressant de déterminer si cette voie a un rôle dans la fonction et le maintien de l'homéostasie des CSH par la TPO ou en réponse à des stress.

Différentes études montrent l'implication de NF- κ B sur la transcription de *Iex-1* en réponse à différents stress comme le TNF α , IL1 β ou les UV (Schäfer et al., 1998) (Wu et al., 1998) (Arlt et al., 2001) (Segev et al., 2000). En utilisant l'inhibiteur Nemo de la voie NF- κ B, nous montrons que cette voie est nécessaire pour augmenter l'expression de IEX-1 en réponse à la TPO et à l'irradiation, faisant de *Iex-1* une cible transcriptionnelle importante de NF- κ B dans les CSH.

Dans les CSH, le signal NF- κ B induit par l'irradiation n'est pas suffisant mais une augmentation de cette activation par la TPO induit un signal assez fort pour permettre l'induction de IEX-1.

C. IEX-1

Iex-1 est un gène précoce induit dans les minutes qui suivent une stimulation par des facteurs de croissance ou des stress comme l'irradiation, les UV ou les virus. Son induction atteint un pic dans les quinze à vingt minutes après la stimulation, de façon similaire à ce que nous observons (Figure 3E de l'article 2). IEX-1 joue de nombreux

rôles et participe à un ensemble de voies importantes dans le métabolisme, l'inflammation, la stabilité de l'ADN et la réponse aux stress (Figure 35).

Dans cette étude, nous montrons que l'expression de IEX-1 est nécessaire et suffisante pour répondre à l'irradiation. En effet, la surexpression de IEX-1 dans les LSK *Mpl*^{-/-} restaure complètement la réparation de l'ADN de ces cellules après irradiation. Nous montrons également que IEX-1 est impliquée dans la voie NHEJ des CSH. Il permet l'interaction de pERK et de la DNA-PK ce qui permet l'activation de cette dernière et promeut la NHEJ. Même si nous n'avons pas étudié le mécanisme, nous pouvons imaginer que IEX-1 sert de protéine plateforme à pERK pour qu'elle phosphoryle DNA-PK comme il a été montré pour d'autres substrats (Letourneux et al., 2006). Nos résultats préliminaires montrent un nombre normal de CSH LSK-CD150⁺CD48⁻ dans les souris *lex-1*^{-/-} et des expériences de transplantation en compétition sont en cours afin de déterminer leur capacité à reconstituer des souris receveuses irradiées de façon létale. Il serait également intéressant d'évaluer le nombre et la capacité de reconstitution des CSH *lex-1*^{-/-} après irradiation.

Nous avons précédemment montré le rôle de IEX-1 dans la réponse aux dommages de l'ADN d'autres types de cellules dans lesquelles la protéine IEX-1 est exprimée en réponse à une forte dose d'irradiation. Elle interagit alors avec une protéine anti-apoptotique de la famille de Bcl2, Mcl-1, et l'emmène dans le noyau. Ce complexe permet l'arrêt du cycle cellulaire en G2/M nécessaire à la réparation de l'ADN (Pawlikowska et al., 2010). Nous avons observé que l'irradiation induit la translocation de Mcl-1 dans les LSK et, confirmant nos résultats précédents, que IEX-1 est nécessaire à cette translocation puisqu'elle n'est pas observée dans les LSK *lex-1*^{-/-}. Cependant, la translocation de Mcl-1 dans le noyau après irradiation est observée en absence de TPO quand les cellules présentent un défaut de réparation de l'ADN (Annexe 2 Figure 2A). De plus, la surexpression de IEX-1 sauvage ou de IEX-1 muté au niveau de son site de fixation pour Mcl-1 restaure la résolution des foci γ H2AX des LSK *Mpl*^{-/-} (Annexe 2 Figure 2B). Ces résultats suggèrent que le niveau basal de *lex-1*, qui est similaire dans les LSK WT et *Mpl*^{-/-}, est suffisant pour

induire la translocation de Mcl-1 dans le noyau. Cependant, il n'est pas impliqué dans la réparation de l'ADN des CSH induite après irradiation par la TPO.

Il serait intéressant de regarder l'importance et le rôle de la translocation de Mcl-1 dans le noyau des CSH après un stress génotoxique. Des expériences de reconstitution de CSH *lex-1*^{-/-} infectées avec un virus exprimant IEX-1 mutée au niveau de son site de fixation pour Mcl-1 permettrait de définir le rôle du complexe IEX-1/Mcl-1 dans la maintenance des CSH. Nous n'avons pas vu d'effet de la TPO sur l'arrêt en G2/M ou G1/S après irradiation. L'analyse du cycle cellulaire des CSH *lex-1*^{-/-} après irradiation permettrait de définir si IEX-1 est également nécessaire au checkpoint et à l'arrêt du cycle cellulaire des CSH après un stress et donc si les CSH *lex-1*^{-/-} ont un défaut double en réponse à l'irradiation, l'un dépendant de la TPO et l'autre indépendant.

D. Conclusion

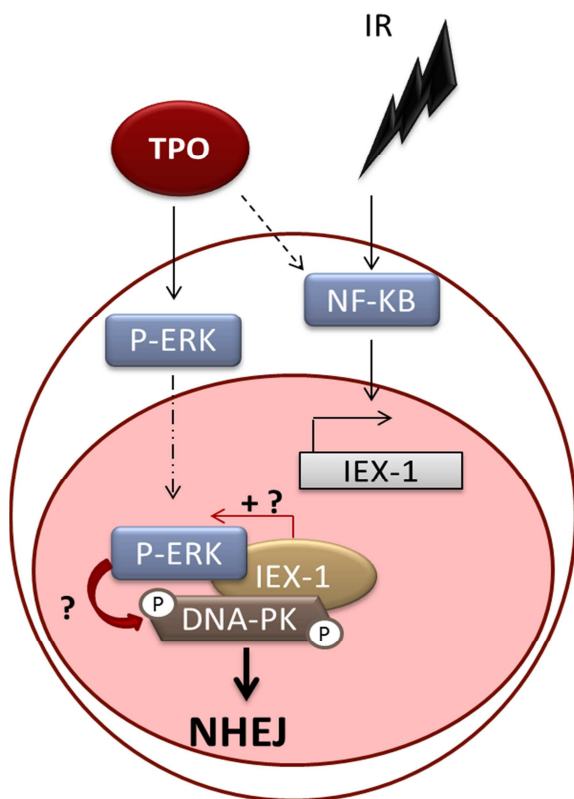


Figure 41 : Voies de signalisation en aval de la TPO impliquées dans l'activation de la DNA-PK et de la NHEJ

Pour conclure cette partie, nous avons montré que la TPO est le principal activateur de la voie ERK/MAPK dans les CSH et qu'elle active et potentialise l'activation de la voie NF- κ B en réponse à l'irradiation. L'activation de NF- κ B induit l'expression de IEX-1. Celui-ci va interagir avec pERK au niveau de son site FTF. Le complexe tripartite formé interagit avec DNA-PKc dans le noyau, ce qui augmente son activation et donc la voie NHEJ. Les cellules vont ainsi être plus efficaces pour réparer leurs cassures d'ADN et donc moins susceptibles d'avoir des mutations et d'être transformées.

III. Importance du niveau de Mpl dans les CSH

A. Mpl et IEX-1 sont-ils suppresseurs de tumeurs ?

Nous avons observé un défaut de réparation et une diminution de l'activité NHEJ dans les LSK Mpl^{+/-} similaires à ceux observés dans les Mpl^{-/-}. De plus, les patients atteints de thrombocytopénie amégacaryocytaire congénitale (CAMT) qui est une maladie due à une mutation perte de fonction de Mpl, semblent avoir un risque plus élevé de développer des leucémies aiguës myéloïdes ou des myélodysplasies. Des études des caryotypes des cellules de la moelle osseuse ou du sang d'un petit nombre de patients ont montré la présence d'anomalies chromosomiques semblables à celles trouvées chez des patients atteints de leucémie ou de myélodysplasie secondaire, c'est-à-dire au niveau des chromosomes 7 et 8 (Steele et al., 2005) (Maserati et al., 2008). Ces anomalies sont retrouvées fréquemment chez des individus ayant subi des radiations atomiques (Rassool, 2003) .

Ces données suggèrent que l'haploinsuffisance de Mpl pourrait avoir un rôle suppresseur de tumeur et que la perte d'une partie ou de la totalité de Mpl pourrait prédisposer au développement de leucémies post radiothérapies. De façon intéressante, six mois après une irradiation de 3 Gy, une souris Mpl^{-/-} a présenté une splénomégalie associée à une érythropoïèse extra-médullaire et un blocage de différenciation érythrocytaire dans la moelle osseuse et dans la rate (Annexe 2 Figure 3). Nous avons testé le potentiel de transformation des cellules de la moelle osseuse de cette souris ainsi que des souris Mpl^{-/-} non malades et des contrôles

sauvages irradiés, en les transplantant dans des souris receveuses. Les cellules de la souris malade ne semblent pas invasives puisque ces cellules n'ont pas reconstituées.

Pour vérifier notre hypothèse que Mpl est un suppresseur de tumeur, différentes cohortes de souris sauvages, Mpl^{-/-} et Mpl^{+/-} ont été irradiées et sont régulièrement suivies. Il serait également intéressant d'analyser le niveau d'expression de Mpl ou de génotyper des patients traités pour une chimiothérapie et de regarder si ceux qui ont un défaut de Mpl sont plus susceptibles de développer une leucémie ou une myélodysplasie secondaire.

En absence de TPO, plusieurs évidences montrent que la voie de réparation utilisée en réponse à une irradiation est la voie Alt-NHEJ. Les progéniteurs Lin-KIT⁺ de souris Mpl^{-/-}, Mpl^{+/-} et IEX-1^{-/-} irradiées ont une diminution d'activité de la voie NHEJ et semblent utiliser la voie Alt-NHEJ. De plus, l'instabilité génomique des progéniteurs de ces souris est augmentée après irradiation. La voie Alt-NHEJ est fortement mutagène car elle induit des mutations délétères et des réarrangements chromosomiques importants comme des délétions, des translocations ou des aberrations pouvant conduire à la transformation des cellules (Ferguson et al., 2000) (Zhang et al., 2010). Plusieurs études montrent que les cellules issues de patients atteints de leucémie myéloïde chronique ou de LAM et exprimant notamment Bcr-Abl et Flt-3-ITD, utilisent la voie Alt-NHEJ pour réparer les cassures d'ADN. L'utilisation de plasmides clivés similaires à celui que nous avons utilisé dans notre étude, montre la création de grandes délétions et l'utilisation de microhomologies lors de la réparation de l'ADN (Sallmyr et al., 2008) (Fan et al., 2010). De plus, PARP1 et la ligase III, deux protéines de la voie Alt-NHEJ, sont augmentées dans les cellules de patients atteints de leucémie myéloïde chronique et exprimant Bcr-Abl. L'inhibition de PARP1 dans ces cellules diminue la réparation par cette voie (Tobin et al., 2013).

L'expression de IEX-1 est modifiée dans différents types de cancer et de pathologies hématopoïétiques (Wu et al., 2013). Une analyse des gènes différentiellement exprimés dans les syndromes myélodysplasiques (MDS) de faible risque et de haut

risque a mis en évidence la protéine IEX-1 comme étant fortement diminuée dans les cellules de patients de faible risque (Hofmann et al., 2002). Ces résultats ont été confirmés dans une autre étude qui met en évidence une corrélation entre le niveau d'expression de IEX-1 dans les CD34⁺ et la survie des patients (Prall et al., 2009). Moins IEX-1 est exprimée dans les cellules de patients atteints de myélodysplasie, plus le patient a un pronostic vital engagé (Santamaría et al., 2012). Cependant, il se pourrait que ce risque soit dû à une sensibilité aux thérapies plutôt qu'à une évolution de la pathologie (de Vries et al, Résumé ASH 2011, n°3817). De la même manière, l'activation de NF- κ B est faible dans les MDS de faible risque et augmente lors de la transformation en LAM (Ettou et al., 2013). Le rôle anti-apoptotique de IEX-1 pourrait être mis en cause dans l'apoptose massive des cellules de patients atteints de MDS, mais il pourrait également être dû à son rôle dans la réparation de l'ADN. Corrélant avec la faible expression de IEX-1 et la faible activation de NF- κ B, les cellules de patients atteints de myélodysplasie de faible risque ont une instabilité génomique importante (Raza and Galili, 2012). L'expression de IEX-1 et l'activation de NF- κ B augmente lors de la transformation. Pour vérifier le rôle suppresseur de tumeur de IEX-1, comme pour les Mpl^{-/-}, des cohortes de souris lex^{-/-} ont été irradiées et sont actuellement suivies.

B. Le niveau de Mpl est déterminant dans l'activation des voies de signalisation

Nous avons montré l'importance de la TPO sur la réparation de l'ADN des cellules sauvages Lin⁻, LSK et LSK-CD34⁻. Cependant, le défaut de réparation observé en absence de TPO est plus important dans les LSK-CD34⁻ que dans les progéniteurs Lin⁻. Ainsi, il semble que plus les cellules sont enrichies en CSH et donc plus elles expriment Mpl, plus la TPO a un rôle important dans la réparation de l'ADN. La TPO n'agissant que sur la voie NHEJ, son effet sur la réparation est moins important dans les Lin⁻ qui sont des cellules proliférantes et qui utilisent probablement en plus, la voie de la RH.

Nos résultats de western blot et de NanoPro montrent que l'activation de ERK est quasiment normale (Annexe 2 Figure 4) dans les LSK Mpl^{+/-} alors qu'elles ont un

défaut de réparation similaire à celui observé dans les $Mpl^{-/-}$. Il serait intéressant de regarder la localisation de pERK suite à l'irradiation et de déterminer si elle est différente dans les cellules $Mpl^{+/-}$. Les LSK des souris $Mpl^{+/-}$ ont un défaut d'expression de *lex-1* semblable à celui observé dans les LSK $Mpl^{-/-}$ en réponse à l'irradiation et à la TPO, et un défaut complet d'activation de NF- κ B similaire à celui observé en absence de TPO. Ainsi, il semblerait qu'une expression forte de *Mpl* soit nécessaire pour permettre l'activation de NF- κ B. De même que pour l'activation de NF- κ B, la phosphorylation de STAT5 est abolie dans les CSH $Mpl^{+/-}$ comparée à celle observée dans les cellules sauvages (Annexe 2 Figure 4). Ces différents résultats montrent que les voies de signalisation en aval de *Mpl* ne nécessitent pas toutes un même niveau d'expression de *Mpl* dans les CSH et qu'il est donc important d'étudier ces voies en détail.

Nous avons réalisé des lentivirus codant pour le gène *c-Mpl* murin portant des mutations équivalentes à celles trouvées chez les patients CAMT de classe II et qui présentent un défaut partiel de la fonction de *Mpl*. Les quatre mutations choisies (*Mpl* R102P, L585W, G604V et P625L) se trouvent dans le domaine intracellulaire de *Mpl* et permettent la fixation de la TPO mais elles induisent un défaut de signalisation (Ballmaier and Germeshausen, 2009). Ces lentivirus, ainsi que celui codant pour *Mpl* sauvage, ont servi à infecter des UT7. Après avoir vérifié la présence des *Mpl* mutés à la membrane en quantité équivalente au sauvage, nous avons regardé la capacité des cellules à réparer l'ADN et à activer DNA-PK après irradiation. Nos résultats préliminaires montrent pour ces quatre mutations, comparées au *Mpl* sauvage, un nombre accru de cellules positives pour γ H2AX et une diminution de l'activation de DNA-PK en présence de TPO. De façon surprenante et comme dans les LSK $Mpl^{+/-}$, les quatre formes mutées de *Mpl* activent normalement ERK. Cependant, nous avons observé une diminution de l'expression de l'ARNm de *lex-1* comparée aux cellules exprimant *Mpl* sauvage après irradiation et stimulation par la TPO. L'activation de la voie NF- κ B est en cours d'étude. Tous ces résultats seront bien sûr à confirmer dans des CSH. Il serait intéressant d'analyser ensuite leur radiorésistance et les niveaux d'aberrations chromosomiques post traitements ainsi que l'altération des voies de signalisation.

Les NMP sont caractérisées par une production anormale et excessive de cellules myéloïdes matures, de façon indépendante des cytokines. La mutation la plus récurrente induisant cette pathologie est le Jak2V617F. Dans les cellules Ba/F3, une faible activation de Jak2 par TPO/Mpl induit une prolifération des cellules tandis qu'à l'inverse, une activation forte de Jak2 conduit à leur arrêt de prolifération (Pecquet et al., 2012). Dans les progéniteurs, ce système permet dans un premier temps, la prolifération des progéniteurs, puis leur maturation en mégacaryocytes lorsque Mpl est plus fortement exprimé. Il a récemment été montré que la présence d'un Jak2V617F induit une diminution de la présence de Mpl à la membrane des plaquettes de souris et des cellules Ba/F3-Mpl, due à une dégradation excessive du récepteur ainsi qu'à un défaut de son recyclage et de sa maturation. La perte de Mpl induit alors une augmentation de la prolifération des cellules (Pecquet et al., 2012). De plus, Mpl est diminué dans les plaquettes et les mégacaryocytes de patients atteints de thrombocytopénies essentielles et de polycythémia vera (Horikawa et al., 1997) (Moliterno et al., 1998).

De façon intéressante, Jak2V617F induit une instabilité génomique dans les cellules Ba/F3 (Plo et al., 2008) et les LSK de souris Knock In JakV617 présentent une accumulation de γ H2AX (Li et al., 2010). Il serait donc intéressant de voir si ce défaut de réparation dans les LSK Knock In est dû à la perte d'un allèle de Mpl.

IV. La TPO induit-elle une chimiorésistance ?

Pour se protéger d'une instabilité génomique trop grande et d'une apoptose massive, les cellules souches leucémiques (CSL) ont mis en place des mécanismes de protection. La réponse aux dommages de l'ADN est souvent dérégulée dans les cellules leucémiques et peut être responsable d'une chimiorésistance. L'activité des voies de réparation est augmentée dans les hémopathies myéloïdes. Dans les leucémies myéloïdes chroniques, la présence de protéine de fusion comme Bcr-Abl augmente la quantité de protéine Rad51, via l'activation de STAT5, conférant une radorésistance aux cellules (Slupianek et al., 2002). L'étude de clones leucémiques sur-exprimant la protéine fusion PML-RAR montre une surexpression de p21 qui est nécessaire au maintien des CSL. En effet, p21 en ralentissant le cycle cellulaire,

permet de limiter le nombre de dommages dans les CSL et donc leur mort par apoptose et leur perte (Viale et al., 2009). Bmi1 est une protéine importante dans l'auto-renouvellement des CSH et des CSL (Lessard and Sauvageau, 2003) et plus récemment il a été observé un rôle de cette protéine dans la réparation de l'ADN des CSH. Bmi1 est rapidement recrutée au niveau du site de cassure où elle inhibe la transcription des gènes ; elle est également importante dans les mécanismes de RH et du checkpoint G2/M (Chagraoui et al., 2011). L'absence de Bmi1 conduit à une hypersensibilité aux stress génotoxiques et une forte instabilité génomique.

Ainsi, les facteurs limitant la prolifération cellulaire et favorisant la réparation de l'ADN limitent les excès de dommages à l'ADN induits par les oncogènes et sont indispensables au maintien des CSH mais aussi des CSL.

Plusieurs études ont démontré que la TPO induit la prolifération de cellules pathologiques indifférenciées, appelées blastes, de patients atteints de myélodysplasie ou de LAM (Corazza et al., 2006). De plus, les patients atteints de LAM qui présentent une forte expression de l'ARNm de Mpl, ont un mauvais pronostic et un taux d'échec élevé à la chimiothérapie (Vigon et al., 1993). Ces données indiquent que la TPO pourrait induire une chimiorésistance des blastes LAM.

Peu de mutations activatrices de Mpl ont été observées dans les LAM. Cependant, l'expression du Mpl sauvage peut-être dérégulée dans ces cellules lors du développement de la leucémie. En effet, Mpl est surexprimé dans les cellules de LAM exprimant AML-1-ETO. Mpl agit alors en activant la voie de prolifération et de survie PI3K/Akt et en augmentant l'expression de la protéine anti-apoptotique Bcl-xL (Pulikkan et al., 2012) (Chou et al., 2012). La TPO pourrait également agir sur la réparation de l'ADN des blastes leucémiques et favoriser la progression de la leucémie. Nous n'avons pas vu d'effet de la TPO sur l'induction de Bmi1. Cependant l'ARNm de p21 est augmenté après irradiation et stimulation TPO, ce qui pourrait contribuer à la chimiorésistance des CSL. Il serait intéressant d'évaluer l'effet de la TPO sur la réparation de l'ADN des CSL, leur propagation, leur résistance à l'irradiation ou à des traitements chimio-thérapeutiques ainsi que les voies de signalisation impliquées. De plus, comme discuté précédemment l'injection de la TPO permet une meilleure reconstruction de la niche après irradiation, indispensable

au maintien des CSH. Elle pourrait aussi favoriser également le maintien des CSL dans la niche.

La voie NF- κ B est activée fortement et constitutivement dans les blastes de leucémie aigüe myéloïde (Birkenkamp et al., 2004) (Chapuis et al., 2010). L'activation de cette voie est liée à un risque de survie faible dans différents cancers, associée à une radio- et chimio-résistance (Aggarwal and Sung, 2011). La voie Ras/MEK/ERK est constitutivement active dans les leucémies induites par la mutation de récepteur à tyrosine kinase comme Flt-3, de composants de la voie comme Ras ou la présence de protéines de fusions comme Bcr-Abl, dans plus de 50% des leucémies myéloïdes. De plus, les agents chimio-thérapeutiques et notamment la production de ROS peuvent activer la voie ERK. L'activation de cette voie est importante dans la radorésistance des cellules cancéreuses (McCubrey et al., 2007). Il serait intéressant de regarder l'activation de DNA-PK dans ces cellules et de déterminer si elle est due à une augmentation de l'interaction entre pERK et DNA-PK.

Ces différentes données suggèrent un effet potentiel néfaste de la TPO favorisant la progression leucémique, et doivent être prises en considération pour l'utilisation de la TPO et de ses agonistes en clinique.

Références

Bibliographiques

- Adams, G.B., Chabner, K.T., Alley, I.R., Olson, D.P., Szczepiorkowski, Z.M., Poznansky, M.C., Kos, C.H., Pollak, M.R., Brown, E.M., and Scadden, D.T. (2006). Stem cell engraftment at the endosteal niche is specified by the calcium-sensing receptor. *Nature* **439**, 599–603.
- Adolfsson, J., Månsson, R., Buza-Vidas, N., Hultquist, A., Liuba, K., Jensen, C.T., Bryder, D., Yang, L., Borge, O.-J., Thoren, L.A.M., et al. (2005). Identification of Flt3⁺ lympho-myeloid stem cells lacking erythro-megakaryocytic potential a revised road map for adult blood lineage commitment. *Cell* **121**, 295–306.
- Aggarwal, B.B., and Sung, B. (2011). NF- κ B in cancer: a matter of life and death. *Cancer Discov* **1**, 469–471.
- Akashi, K., Traver, D., Miyamoto, T., and Weissman, I.L. (2000). A clonogenic common myeloid progenitor that gives rise to all myeloid lineages. *Nature* **404**, 193–197.
- Alcamo, E., Hacohen, N., Schulte, L.C., Rennert, P.D., Hynes, R.O., and Baltimore, D. (2002). Requirement for the NF-kappaB family member RelA in the development of secondary lymphoid organs. *J. Exp. Med.* **195**, 233–244.
- Alexander, W.S., Roberts, A.W., Nicola, N.A., Li, R., and Metcalf, D. (1996). Deficiencies in progenitor cells of multiple hematopoietic lineages and defective megakaryocytopoiesis in mice lacking the thrombopoietic receptor c-Mpl. *Blood* **87**, 2162–2170.
- Allen, C., Kurimasa, A., Brenneman, M.A., Chen, D.J., and Nickoloff, J.A. (2002). DNA-dependent protein kinase suppresses double-strand break-induced and spontaneous homologous recombination. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **99**, 3758–3763.
- Arai, A., Kanda, E., and Miura, O. (2002). Rac is activated by erythropoietin or interleukin-3 and is involved in activation of the Erk signaling pathway. *Oncogene* **21**, 2641–2651.
- Arai, F., Hirao, A., Ohmura, M., Sato, H., Matsuoka, S., Takubo, K., Ito, K., Koh, G.Y., and Suda, T. (2004). Tie2/angiopoietin-1 signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence in the bone marrow niche. *Cell* **118**, 149–161.
- Arai, F., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., and Suda, T. (2009). Niche regulation of hematopoietic stem cells in the endosteum. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1176**, 36–46.
- Arlt, A., Grobe, O., Sieke, A., Kruse, M.L., Fölsch, U.R., Schmidt, W.E., and Schäfer, H. (2001). Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in Hela cells. *Oncogene* **20**, 69–76.
- Arlt, A., Minkenberg, J., Kruse, M.-L., Grohmann, F., Fölsch, U.R., and Schäfer, H. (2007). Immediate early gene-X1 interferes with 26 S proteasome activity by attenuating expression of the 19 S proteasomal components S5a/Rpn10 and S1/Rpn2. *Biochem. J.* **402**, 367–375.
- Askenasy, N., and Farkas, D.L. (2003). In vivo imaging studies of the effect of recipient conditioning, donor cell phenotype and antigen disparity on homing of haematopoietic cells to the bone marrow. *Br. J. Haematol.* **120**, 505–515.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2004). Involvement of poly(ADP-ribose) polymerase-1 and XRCC1/DNA ligase III in an alternative route for DNA double-strand breaks rejoining. *J. Biol. Chem.* **279**, 55117–55126.

Audebert, M., Salles, B., and Calsou, P. (2008). Effect of double-strand break DNA sequence on the PARP-1 NHEJ pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **369**, 982–988.

Avecilla, S.T., Hattori, K., Heissig, B., Tejada, R., Liao, F., Shido, K., Jin, D.K., Dias, S., Zhang, F., Hartman, T.E., et al. (2004). Chemokine-mediated interaction of hematopoietic progenitors with the bone marrow vascular niche is required for thrombopoiesis. *Nat. Med.* **10**, 64–71.

-B-

Bacon, C.M., Tortolani, P.J., Shimosaka, A., Rees, R.C., Longo, D.L., and O'Shea, J.J. (1995). Thrombopoietin (TPO) induces tyrosine phosphorylation and activation of STAT5 and STAT3. *FEBS Lett.* **370**, 63–68.

Balazs, A.B., Fabian, A.J., Esmon, C.T., and Mulligan, R.C. (2006). Endothelial protein C receptor (CD201) explicitly identifies hematopoietic stem cells in murine bone marrow. *Blood* **107**, 2317–2321.

Ballmaier, M., and Germeshausen, M. (2009). Advances in the understanding of congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* **146**, 3–16.

Bandyopadhyay, D., Mandal, M., Adam, L., Mendelsohn, J., and Kumar, R. (1998). Physical interaction between epidermal growth factor receptor and DNA-dependent protein kinase in mammalian cells. *J. Biol. Chem.* **273**, 1568–1573.

Barker, J.E. (1994). Sl/Sld hematopoietic progenitors are deficient in situ. *Exp. Hematol.* **22**, 174–177.

Bartek, J., and Lukas, J. (2001). Mammalian G1- and S-phase checkpoints in response to DNA damage. *Curr. Opin. Cell Biol.* **13**, 738–747.

Bartek, J., and Lukas, J. (2003). Chk1 and Chk2 kinases in checkpoint control and cancer. *Cancer Cell* **3**, 421–429.

Bartley, T.D., Bogenberger, J., Hunt, P., Li, Y.S., Lu, H.S., Martin, F., Chang, M.S., Samal, B., Nichol, J.L., and Swift, S. (1994). Identification and cloning of a megakaryocyte growth and development factor that is a ligand for the cytokine receptor Mpl. *Cell* **77**, 1117–1124.

Basser, R.L., O'Flaherty, E., Green, M., Edmonds, M., Nichol, J., Menchaca, D.M., Cohen, B., and Begley, C.G. (2002). Development of pancytopenia with neutralizing antibodies to thrombopoietin after multicycle chemotherapy supported by megakaryocyte growth and development factor. *Blood* **99**, 2599–2602.

Bassing, C.H., Swat, W., and Alt, F.W. (2002). The mechanism and regulation of chromosomal V(D)J recombination. *Cell* **109 Suppl**, S45–55.

Batchelor, E., Loewer, A., and Lahav, G. (2009). The ups and downs of p53: understanding protein dynamics in single cells. *Nat. Rev. Cancer* **9**, 371–377.

Bekker-Jensen, S., Lukas, C., Kitagawa, R., Melander, F., Kastan, M.B., Bartek, J., and Lukas, J. (2006). Spatial organization of the mammalian genome surveillance machinery in response to DNA strand breaks. *J. Cell Biol.* **173**, 195–206.

- Bender, C.F., Sikes, M.L., Sullivan, R., Huye, L.E., Le Beau, M.M., Roth, D.B., Mirzoeva, O.K., Oltz, E.M., and Petrini, J.H.J. (2002). Cancer predisposition and hematopoietic failure in Rad50(S/S) mice. *Genes Dev.* **16**, 2237–2251.
- Bennardo, N., Cheng, A., Huang, N., and Stark, J.M. (2008). Alternative-NHEJ is a mechanistically distinct pathway of mammalian chromosome break repair. *PLoS Genet.* **4**, e1000110.
- Benveniste, P., Frelin, C., Janmohamed, S., Barbara, M., Herrington, R., Hyam, D., and Iscove, N.N. (2010). Intermediate-term hematopoietic stem cells with extended but time-limited reconstitution potential. *Cell Stem Cell* **6**, 48–58.
- Bersenev, A., Wu, C., Balcerak, J., and Tong, W. (2008). Lnk controls mouse hematopoietic stem cell self-renewal and quiescence through direct interactions with JAK2. *J. Clin. Invest.* **118**, 2832–2844.
- Bhardwaj, G., Murdoch, B., Wu, D., Baker, D.P., Williams, K.P., Chadwick, K., Ling, L.E., Karanu, F.N., and Bhatia, M. (2001). Sonic hedgehog induces the proliferation of primitive human hematopoietic cells via BMP regulation. *Nat. Immunol.* **2**, 172–180.
- Bianco, P.R., Tracy, R.B., and Kowalczykowski, S.C. (1998). DNA strand exchange proteins: a biochemical and physical comparison. *Front. Biosci.* **3**, D570–603.
- Birkenkamp, K.U., Geugien, M., Schepers, H., Westra, J., Lemmink, H.H., and Vellenga, E. (2004). Constitutive NF-kappaB DNA-binding activity in AML is frequently mediated by a Ras/PI3-K/PKB-dependent pathway. *Leukemia* **18**, 103–112.
- Blanpain, C., Mohrin, M., Sotiropoulou, P.A., and Passegué, E. (2011). DNA-damage response in tissue-specific and cancer stem cells. *Cell Stem Cell* **8**, 16–29.
- Boddy, M.N., Gaillard, P.H., McDonald, W.H., Shanahan, P., Yates, J.R., 3rd, and Russell, P. (2001). Mus81-Eme1 are essential components of a Holliday junction resolvase. *Cell* **107**, 537–548.
- Bothmer, A., Robbiani, D.F., Feldhahn, N., Gazumyan, A., Nussenzweig, A., and Nussenzweig, M.C. (2010). 53BP1 regulates DNA resection and the choice between classical and alternative end joining during class switch recombination. *J. Exp. Med.* **207**, 855–865.
- Bouscary, D., Lecoq-Lafon, C., Chrétien, S., Zompi, S., Fichelson, S., Muller, O., Porteu, F., Dusanter-Fourt, I., Gisselbrecht, S., Mayeux, P., et al. (2001). Role of Gab proteins in phosphatidylinositol 3-kinase activation by thrombopoietin (Tpo). *Oncogene* **20**, 2197–2204.
- Bouwman, P., Aly, A., Escandell, J.M., Pieterse, M., Bartkova, J., Van der Gulden, H., Hiddingh, S., Thanasoula, M., Kulkarni, A., Yang, Q., et al. (2010). 53BP1 loss rescues BRCA1 deficiency and is associated with triple-negative and BRCA-mutated breast cancers. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **17**, 688–695.
- Bradley, T.R., and Metcalf, D. (1966). The growth of mouse bone marrow cells in vitro. *Aust J Exp Biol Med Sci* **44**, 287–299.
- Brouard, N., Driessen, R., Short, B., and Simmons, P.J. (2010). G-CSF increases mesenchymal precursor cell numbers in the bone marrow via an indirect mechanism involving osteoclast-mediated bone resorption. *Stem Cell Res* **5**, 65–75.

Broudy, V.C., Lin, N.L., and Kaushansky, K. (1995). Thrombopoietin (c-mpl ligand) acts synergistically with erythropoietin, stem cell factor, and interleukin-11 to enhance murine megakaryocyte colony growth and increases megakaryocyte ploidy in vitro. *Blood* 85, 1719–1726.

Brown, M.A., Metcalf, D., and Gough, N.M. (1994). Leukaemia inhibitory factor and interleukin 6 are expressed at very low levels in the normal adult mouse and are induced by inflammation. *Cytokine* 6, 300–309.

Buis, J., Stoneham, T., Spehalski, E., and Ferguson, D.O. (2012). Mre11 regulates CtIP-dependent double-strand break repair by interaction with CDK2. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 246–252.

Bunting, S.F., Callén, E., Wong, N., Chen, H.-T., Polato, F., Gunn, A., Bothmer, A., Feldhahn, N., Fernandez-Capetillo, O., Cao, L., et al. (2010). 53BP1 inhibits homologous recombination in Brca1-deficient cells by blocking resection of DNA breaks. *Cell* 141, 243–254.

Burma, S., Chen, B.P.C., and Chen, D.J. (2006). Role of non-homologous end joining (NHEJ) in maintaining genomic integrity. *DNA Repair (Amst.)* 5, 1042–1048.

-C-

Calvi, L.M., Adams, G.B., Weibrecht, K.W., Weber, J.M., Olson, D.P., Knight, M.C., Martin, R.P., Schipani, E., Divieti, P., Bringhurst, F.R., et al. (2003). Osteoblastic cells regulate the haematopoietic stem cell niche. *Nature* 425, 841–846.

Campisi, J., and D'Adda di Fagagna, F. (2007). Cellular senescence: when bad things happen to good cells. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 729–740.

Cancelas, J.A., Lee, A.W., Prabhakar, R., Stringer, K.F., Zheng, Y., and Williams, D.A. (2005). Rac GTPases differentially integrate signals regulating hematopoietic stem cell localization. *Nat. Med.* 11, 886–891.

Cardier, J.E., and Dempsey, J. (1998). Thrombopoietin and its receptor, c-mpl, are constitutively expressed by mouse liver endothelial cells: evidence of thrombopoietin as a growth factor for liver endothelial cells. *Blood* 91, 923–929.

Chagraoui, J., Hébert, J., Girard, S., and Sauvageau, G. (2011). An anticlastogenic function for the Polycomb Group gene Bmi1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108, 5284–5289.

Chaligné, R., Tonetti, C., Besancenot, R., Roy, L., Marty, C., Mossuz, P., Kiladjian, J.-J., Socié, G., Bordessoule, D., Le Bousse-Kerdilès, M.-C., et al. (2008). New mutations of MPL in primitive myelofibrosis: only the MPL W515 mutations promote a G1/S-phase transition. *Leukemia* 22, 1557–1566.

Chan, D.W., Chen, B.P.-C., Prithivirajasingh, S., Kurimasa, A., Story, M.D., Qin, J., and Chen, D.J. (2002). Autophosphorylation of the DNA-dependent protein kinase catalytic subunit is required for rejoining of DNA double-strand breaks. *Genes Dev.* 16, 2333–2338.

Chan, G., Gu, S., and Neel, B.G. (2013). Erk1 and Erk2 are required for maintenance of hematopoietic stem cells and adult hematopoiesis. *Blood* 121, 3594–3598.

Chan, K.-K., Shen, L., Au, W.-Y., Yuen, H.-F., Wong, K.-Y., Guo, T., Wong, M.L., Shimizu, N., Tsuchiyama, J., Kwong, Y.-L., et al. (2010). Interleukin-2 induces NF-kappaB activation through BCL10 and affects its subcellular localization in natural killer lymphoma cells. *J. Pathol.* 221, 164–174.

Chang, L., and Karin, M. (2001). Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 410, 37–40.

Chapuis, N., Park, S., Leotoing, L., Tamburini, J., Verdier, F., Bardet, V., Green, A.S., Willems, L., Agou, F., Ifrah, N., et al. (2010). I κ B kinase overcomes PI3K/Akt and ERK/MAPK to control FOXO3a activity in acute myeloid leukemia. *Blood* 116, 4240–4250.

Chen, L., Nievera, C.J., Lee, A.Y.-L., and Wu, X. (2008). Cell cycle-dependent complex formation of BRCA1.CtIP.MRN is important for DNA double-strand break repair. *J. Biol. Chem.* 283, 7713–7720.

Cheng, G. (2012). Eltrombopag, a thrombopoietin- receptor agonist in the treatment of adult chronic immune thrombocytopenia: a review of the efficacy and safety profile. *Ther Adv Hematol* 3, 155–164.

Cheng, T., Rodrigues, N., Shen, H., Yang, Y., Dombkowski, D., Sykes, M., and Scadden, D.T. (2000). Hematopoietic stem cell quiescence maintained by p21cip1/waf1. *Science* 287, 1804–1808.

Choi, E.S., Hokom, M., Bartley, T., Li, Y.S., Ohashi, H., Kato, T., Nichol, J.L., Skrine, J., Knudten, A., and Chen, J. (1995). Recombinant human megakaryocyte growth and development factor (rHuMGDF), a ligand for c-Mpl, produces functional human platelets in vitro. *Stem Cells* 13, 317–322.

Chou, F.-S., Griesinger, A., Wunderlich, M., Lin, S., Link, K.A., Shrestha, M., Goyama, S., Mizukawa, B., Shen, S., Marcucci, G., et al. (2012). The thrombopoietin/MPL/Bcl-xL pathway is essential for survival and self-renewal in human preleukemia induced by AML1-ETO. *Blood* 120, 709–719.

Christensen, J.L., and Weissman, I.L. (2001). Flk-2 is a marker in hematopoietic stem cell differentiation: a simple method to isolate long-term stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98, 14541–14546.

Chung, E., Hsu, C.-L., and Kondo, M. (2011). Constitutive MAP kinase activation in hematopoietic stem cells induces a myeloproliferative disorder. *PLoS ONE* 6, e28350.

Cimprich, K.A., and Cortez, D. (2008). ATR: an essential regulator of genome integrity. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 616–627.

Cipolleschi, M.G., Dello Sbarba, P., and Olivotto, M. (1993). The role of hypoxia in the maintenance of hematopoietic stem cells. *Blood* 82, 2031–2037.

Civin, C.I., Strauss, L.C., Brovall, C., Fackler, M.J., Schwartz, J.F., and Shaper, J.H. (1984). Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. *J. Immunol.* 133, 157–165.

Collado, M., Blasco, M.A., and Serrano, M. (2007). Cellular senescence in cancer and aging. *Cell* 130, 223–233.

Cooney, R.N. (2002). Suppressors of cytokine signaling (SOCS): inhibitors of the JAK/STAT pathway. *Shock* 17, 83–90.

Corazza, F., Hermans, C., D’Hondt, S., Ferster, A., Kentos, A., Benoît, Y., and Sariban, E. (2006). Circulating thrombopoietin as an in vivo growth factor for blast cells in acute myeloid leukemia. *Blood* 107, 2525–2530.

Cui, X., Yu, Y., Gupta, S., Cho, Y.-M., Lees-Miller, S.P., and Meek, K. (2005). Autophosphorylation of DNA-dependent protein kinase regulates DNA end processing and may also alter double-strand break repair pathway choice. *Mol. Cell. Biol.* 25, 10842–10852.

Cumano, A., and Godin, I. (2007). Ontogeny of the hematopoietic system. *Annu. Rev. Immunol.* 25, 745–785.

-D-

Dahlen, D.D., Broudy, V.C., and Drachman, J.G. (2003). Internalization of the thrombopoietin receptor is regulated by 2 cytoplasmic motifs. *Blood* 102, 102–108.

Debili, N., Wendling, F., Katz, A., Guichard, J., Breton-Gorius, J., Hunt, P., and Vainchenker, W. (1995). The Mpl-ligand or thrombopoietin or megakaryocyte growth and differentiative factor has both direct proliferative and differentiative activities on human megakaryocyte progenitors. *Blood* 86, 2516–2525.

DeFazio, L.G., Stansel, R.M., Griffith, J.D., and Chu, G. (2002). Synapsis of DNA ends by DNA-dependent protein kinase. *EMBO J.* 21, 3192–3200.

Denhardt, D.T., and Guo, X. (1993). Osteopontin: a protein with diverse functions. *FASEB J.* 7, 1475–1482.

Deveaux, S., Filipe, A., Lemarchandel, V., Ghysdael, J., Roméo, P.H., and Mignotte, V. (1996). Analysis of the thrombopoietin receptor (MPL) promoter implicates GATA and Ets proteins in the coregulation of megakaryocyte-specific genes. *Blood* 87, 4678–4685.

Dianov, G.L., and Parsons, J.L. (2007). Co-ordination of DNA single strand break repair. *DNA Repair (Amst.)* 6, 454–460.

Difilippantonio, M.J., Zhu, J., Chen, H.T., Meffre, E., Nussenzweig, M.C., Max, E.E., Ried, T., and Nussenzweig, A. (2000). DNA repair protein Ku80 suppresses chromosomal aberrations and malignant transformation. *Nature* 404, 510–514.

Ding, L., and Morrison, S.J. (2013). Haematopoietic stem cells and early lymphoid progenitors occupy distinct bone marrow niches. *Nature* 495, 231–235.

Ding, J., Komatsu, H., Iida, S., Yano, H., Kusumoto, S., Inagaki, A., Mori, F., Ri, M., Ito, A., Wakita, A., et al. (2009). The Asn505 mutation of the c-MPL gene, which causes familial essential thrombocythemia, induces autonomous homodimerization of the c-Mpl protein due to strong amino acid polarity. *Blood* 114, 3325–3328.

Ding, L., Saunders, T.L., Enikolopov, G., and Morrison, S.J. (2012). Endothelial and perivascular cells maintain haematopoietic stem cells. *Nature* 481, 457–462.

Dittmann, K., Mayer, C., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Raju, U., Milas, L., Chen, D.J., Kehlbach, R., and Rodemann, H.P. (2005). Radiation-induced epidermal growth factor receptor nuclear import is linked to activation of DNA-dependent protein kinase. *J. Biol. Chem.* 280, 31182–31189.

Dobbs, T.A., Tainer, J.A., and Lees-Miller, S.P. (2010). A structural model for regulation of NHEJ by DNA-PKcs autophosphorylation. *DNA Repair (Amst.)* 9, 1307–1314.

Domen, J., and Weissman, I.L. (1999). Self-renewal, differentiation or death: regulation and manipulation of hematopoietic stem cell fate. *Mol Med Today* 5, 201–208.

Dominici, M., Rasini, V., Bussolari, R., Chen, X., Hofmann, T.J., Spano, C., Bernabei, D., Veronesi, E., Bertoni, F., Paolucci, P., et al. (2009). Restoration and reversible expansion of the osteoblastic hematopoietic stem cell niche after marrow radioablation. *Blood* 114, 2333–2343.

Dorsch, M., Fan, P.D., Bogenberger, J., and Goff, S.P. (1995). TPO and IL-3 induce overlapping but distinct protein tyrosine phosphorylation in a myeloid precursor cell line. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 214, 424–431.

Douglas, P., Sapkota, G.P., Morrice, N., Yu, Y., Goodarzi, A.A., Merkle, D., Meek, K., Alessi, D.R., and Lees-Miller, S.P. (2002). Identification of in vitro and in vivo phosphorylation sites in the catalytic subunit of the DNA-dependent protein kinase. *Biochem. J.* 368, 243–251.

Doulatov, S., Notta, F., Laurenti, E., and Dick, J.E. (2012). Hematopoiesis: a human perspective. *Cell Stem Cell* 10, 120–136.

Downs, J.A., and Jackson, S.P. (2004). A means to a DNA end: the many roles of Ku. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 367–378.

Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1997). Dissecting the thrombopoietin receptor: functional elements of the Mpl cytoplasmic domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94, 2350–2355.

Drachman, J.G., Griffin, J.D., and Kaushansky, K. (1995). The c-Mpl ligand (thrombopoietin) stimulates tyrosine phosphorylation of Jak2, Shc, and c-Mpl. *J. Biol. Chem.* 270, 4979–4982.

Drachman, J.G., Millett, K.M., and Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin signal transduction requires functional JAK2, not TYK2. *J. Biol. Chem.* 274, 13480–13484.

Dudley, D.D., Chaudhuri, J., Bassing, C.H., and Alt, F.W. (2005). Mechanism and control of V(D)J recombination versus class switch recombination: similarities and differences. *Adv. Immunol.* 86, 43–112.

Dumble, M., Moore, L., Chambers, S.M., Geiger, H., Van Zant, G., Goodell, M.A., and Donehower, L.A. (2007). The impact of altered p53 dosage on hematopoietic stem cell dynamics during aging. *Blood* 109, 1736–1742.

-E-

Ehrlich, M., Norris, K.F., Wang, R.Y., Kuo, K.C., and Gehrke, C.W. (1986). DNA cytosine methylation and heat-induced deamination. *Biosci. Rep.* 6, 387–393.

El-Badri, N.S., Wang, B.Y., Cherry, and Good, R.A. (1998). Osteoblasts promote engraftment of allogeneic hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 26, 110–116.

Ema, H., Takano, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2000). In vitro self-renewal division of hematopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 192, 1281–1288.

Ettou, S., Humbrecht, C., Benet, B., Billot, K., D’Allard, D., Mariot, V., Goodhardt, M., Kosmider, O., Mayeux, P., Solary, E., et al. (2013). Epigenetic control of NFκB dependent FAS gene transcription during progression of myelodysplastic syndromes. *Mol. Cancer Res.*

Ezumi, Y., Takayama, H., and Okuma, M. (1995). Thrombopoietin, c-Mpl ligand, induces tyrosine phosphorylation of Tyk2, JAK2, and STAT3, and enhances agonists-induced aggregation in platelets in vitro. *FEBS Lett.* 374, 48–52.

-F-

Fan, J., Li, L., Small, D., and Rassool, F. (2010). Cells expressing FLT3/ITD mutations exhibit elevated repair errors generated through alternative NHEJ pathways: implications for genomic instability and therapy. *Blood* 116, 5298–5305.

Feldmann, E., Schmiemann, V., Goedecke, W., Reichenberger, S., and Pfeiffer, P. (2000). DNA double-strand break repair in cell-free extracts from Ku80-deficient cells: implications for Ku serving as an alignment factor in non-homologous DNA end joining. *Nucleic Acids Res.* 28, 2585–2596.

Feldmann, K.A., Pittelkow, M.R., Roche, P.C., Kumar, R., and Grande, J.P. (2001). Expression of an immediate early gene, IEX-1, in human tissues. *Histochem. Cell Biol.* 115, 489–497.

Ferguson, B.J., Mansur, D.S., Peters, N.E., Ren, H., and Smith, G.L. (2012). DNA-PK is a DNA sensor for IRF-3-dependent innate immunity. *Elife* 1, e00047.

Ferguson, D.O., Sekiguchi, J.M., Chang, S., Frank, K.M., Gao, Y., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). The nonhomologous end-joining pathway of DNA repair is required for genomic stability and the suppression of translocations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 6630–6633.

Fichelson, S., Freyssinier, J.M., Picard, F., Fontenay-Roupie, M., Guesnu, M., Cherai, M., Gisselbrecht, S., and Porteu, F. (1999). Megakaryocyte growth and development factor-induced proliferation and differentiation are regulated by the mitogen-activated protein kinase pathway in primitive cord blood hematopoietic progenitors. *Blood* 94, 1601–1613.

Fleming, H.E., Janzen, V., Lo Celso, C., Guo, J., Leahy, K.M., Kronenberg, H.M., and Scadden, D.T. (2008). Wnt signaling in the niche enforces hematopoietic stem cell quiescence and is necessary to preserve self-renewal in vivo. *Cell Stem Cell* 2, 274–283.

Flygare, J., Armstrong, R.C., Wennborg, A., Orsan, S., and Hellgren, D. (1998). Proteolytic cleavage of HsRad51 during apoptosis. *FEBS Lett.* 427, 247–251.

Folman, C.C., De Jong, S.M., De Haas, M., and Von dem Borne, A.E. (2001). Analysis of the kinetics of TPO uptake during platelet transfusion. *Transfusion* 41, 517–521.

Foudi, A., Hochedlinger, K., Van Buren, D., Schindler, J.W., Jaenisch, R., Carey, V., and Hock, H. (2009). Analysis of histone 2B-GFP retention reveals slowly cycling hematopoietic stem cells. *Nat. Biotechnol.* 27, 84–90.

Fox, N., Priestley, G., Papayannopoulou, T., and Kaushansky, K. (2002). Thrombopoietin expands hematopoietic stem cells after transplantation. *J. Clin. Invest.* 110, 389–394.

Frenette, P.S., and Weiss, L. (2000). Sulfated glycans induce rapid hematopoietic progenitor cell mobilization: evidence for selectin-dependent and independent mechanisms. *Blood* 96, 2460–2468.

Fridman, J.S., and Lowe, S.W. (2003). Control of apoptosis by p53. *Oncogene* 22, 9030–9040.

Fujisaki, J., Wu, J., Carlson, A.L., Silberstein, L., Putheti, P., Larocca, R., Gao, W., Saito, T.I., Lo Celso, C., Tsuyuzaki, H., et al. (2011). In vivo imaging of Treg cells providing immune privilege to the haematopoietic stem-cell niche. *Nature* 474, 216–219.

- Gao, Y., Ferguson, D.O., Xie, W., Manis, J.P., Sekiguchi, J., Frank, K.M., Chaudhuri, J., Horner, J., DePinho, R.A., and Alt, F.W. (2000). Interplay of p53 and DNA-repair protein XRCC4 in tumorigenesis, genomic stability and development. *Nature* **404**, 897–900.
- Garcia, J., De Gunzburg, J., Eychène, A., Gisselbrecht, S., and Porteu, F. (2001). Thrombopoietin-mediated sustained activation of extracellular signal-regulated kinase in UT7-Mpl cells requires both Ras-Raf-1- and Rap1-B-Raf-dependent pathways. *Mol. Cell. Biol.* **21**, 2659–2670.
- Garcia, J., Ye, Y., Arranz, V., Letourneux, C., Pezeron, G., and Porteu, F. (2002). IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *EMBO J.* **21**, 5151–5163.
- Garcia, V., Phelps, S.E.L., Gray, S., and Neale, M.J. (2011). Bidirectional resection of DNA double-strand breaks by Mre11 and Exo1. *Nature* **479**, 241–244.
- Geddis, A.E., Fox, N.E., and Kaushansky, K. (2001). Phosphatidylinositol 3-kinase is necessary but not sufficient for thrombopoietin-induced proliferation in engineered Mpl-bearing cell lines as well as in primary megakaryocytic progenitors. *J. Biol. Chem.* **276**, 34473–34479.
- Geddis, A.E., Linden, H.M., and Kaushansky, K. (2002). Thrombopoietin: a pan-hematopoietic cytokine. *Cytokine Growth Factor Rev.* **13**, 61–73.
- Germeshausen, M., Ballmaier, M., and Welte, K. (2006). MPL mutations in 23 patients suffering from congenital amegakaryocytic thrombocytopenia: the type of mutation predicts the course of the disease. *Hum. Mutat.* **27**, 296.
- Gerondakis, S., Banerjee, A., Grigoriadis, G., Vasanthakumar, A., Gugasyan, R., Sidwell, T., and Grumont, R.J. (2012). NF- κ B subunit specificity in hemopoiesis. *Immunol. Rev.* **246**, 272–285.
- Ghilardi, N., Wiestner, A., Kikuchi, M., Ohsaka, A., and Skoda, R.C. (1999). Hereditary thrombocythaemia in a Japanese family is caused by a novel point mutation in the thrombopoietin gene. *Br. J. Haematol.* **107**, 310–316.
- Gilmore, T.D. (2006). Introduction to NF-kappaB: players, pathways, perspectives. *Oncogene* **25**, 6680–6684.
- Golding, S.E., Rosenberg, E., Neill, S., Dent, P., Povirk, L.F., and Valerie, K. (2007). Extracellular signal-related kinase positively regulates ataxia telangiectasia mutated, homologous recombination repair, and the DNA damage response. *Cancer Res.* **67**, 1046–1053.
- Golding, S.E., Morgan, R.N., Adams, B.R., Hawkins, A.J., Povirk, L.F., and Valerie, K. (2009). Pro-survival AKT and ERK signaling from EGFR and mutant EGFRvIII enhances DNA double-strand break repair in human glioma cells. *Cancer Biol. Ther.* **8**, 730–738.
- Gong, J.K. (1978). Endosteal marrow: a rich source of hematopoietic stem cells. *Science* **199**, 1443–1445.
- Goodarzi, A.A., Jeggo, P., and Lobrich, M. (2010). The influence of heterochromatin on DNA double strand break repair: Getting the strong, silent type to relax. *DNA Repair (Amst.)* **9**, 1273–1282.

Goodell, M.A., Brose, K., Paradis, G., Conner, A.S., and Mulligan, R.C. (1996). Isolation and functional properties of murine hematopoietic stem cells that are replicating in vivo. *J. Exp. Med.* **183**, 1797–1806.

GOODMAN, J.W., and HODGSON, G.S. (1962). Evidence for stem cells in the peripheral blood of mice. *Blood* **19**, 702–714.

Gottlieb, T.M., and Jackson, S.P. (1993). The DNA-dependent protein kinase: requirement for DNA ends and association with Ku antigen. *Cell* **72**, 131–142.

Grawunder, U., Wilm, M., Wu, X., Kulesza, P., Wilson, T.E., Mann, M., and Lieber, M.R. (1997). Activity of DNA ligase IV stimulated by complex formation with XRCC4 protein in mammalian cells. *Nature* **388**, 492–495.

Greenbaum, A., Hsu, Y.-M.S., Day, R.B., Schuettpelz, L.G., Christopher, M.J., Borgerding, J.N., Nagasawa, T., and Link, D.C. (2013). CXCL12 in early mesenchymal progenitors is required for haematopoietic stem-cell maintenance. *Nature* **495**, 227–230.

Grobe, O., Arlt, A., Ungefroren, H., Krupp, G., Fölsch, U.R., Schmidt, W.E., and Schäfer, H. (2001). Functional disruption of IEX-1 expression by concatemeric hammerhead ribozymes alters growth properties of 293 cells. *FEBS Lett.* **494**, 196–200.

Grossmann, M., Metcalf, D., Merryfull, J., Beg, A., Baltimore, D., and Gerondakis, S. (1999). The combined absence of the transcription factors Rel and RelA leads to multiple hemopoietic cell defects. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **96**, 11848–11853.

Gu, J., Lu, H., Tippin, B., Shimazaki, N., Goodman, M.F., and Lieber, M.R. (2007). XRCC4:DNA ligase IV can ligate incompatible DNA ends and can ligate across gaps. *EMBO J.* **26**, 1010–1023.

Guerriero, R., Parolini, I., Testa, U., Samoggia, P., Petrucci, E., Sargiacomo, M., Chelucci, C., Gabbianelli, M., and Peschle, C. (2006). Inhibition of TPO-induced MEK or mTOR activity induces opposite effects on the ploidy of human differentiating megakaryocytes. *J. Cell. Sci.* **119**, 744–752.

Guirouilh-Barbat, J., Huck, S., Bertrand, P., Pirzio, L., Desmaze, C., Sabatier, L., and Lopez, B.S. (2004). Impact of the KU80 pathway on NHEJ-induced genome rearrangements in mammalian cells. *Mol. Cell* **14**, 611–623.

Guirouilh-Barbat, J., Rass, E., Plo, I., Bertrand, P., and Lopez, B.S. (2007). Defects in XRCC4 and KU80 differentially affect the joining of distal nonhomologous ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 20902–20907.

Gunsilius, E., Gastl, G., and Petzer, A.L. (2001). Hematopoietic stem cells. *Biomed. Pharmacother.* **55**, 186–194.

Gurney, A.L., Carver-Moore, K., De Sauvage, F.J., and Moore, M.W. (1994). Thrombocytopenia in c-mpl-deficient mice. *Science* **265**, 1445–1447.



Habraken, Y., and Piette, J. (2006). NF-kappaB activation by double-strand breaks. *Biochem. Pharmacol.* **72**, 1132–1141.

- Hackett, J.A., and Greider, C.W. (2003). End resection initiates genomic instability in the absence of telomerase. *Mol. Cell. Biol.* 23, 8450–8461.
- Hadian, K., and Krappmann, D. (2011). Signals from the nucleus: activation of NF-kappaB by cytosolic ATM in the DNA damage response. *Sci Signal* 4, pe2.
- Hakem, R. (2008). DNA-damage repair; the good, the bad, and the ugly. *EMBO J.* 27, 589–605.
- Hamelin, V., Letourneux, C., Romeo, P.-H., Porteu, F., and Gaudry, M. (2006). Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood* 107, 3106–3113.
- Han, Z., Malik, N., Carter, T., Reeves, W.H., Wyche, J.H., and Hendrickson, E.A. (1996). DNA-dependent protein kinase is a target for a CPP32-like apoptotic protease. *J. Biol. Chem.* 271, 25035–25040.
- Harfouche, G., Vaigot, P., Rachidi, W., Rigaud, O., Moratille, S., Marie, M., Lemaitre, G., Fortunel, N.O., and Martin, M.T. (2010). Fibroblast growth factor type 2 signaling is critical for DNA repair in human keratinocyte stem cells. *Stem Cells* 28, 1639–1648.
- Harker, L.A., Marzec, U.M., Hunt, P., Kelly, A.B., Tomer, A., Cheung, E., Hanson, S.R., and Stead, R.B. (1996). Dose-response effects of pegylated human megakaryocyte growth and development factor on platelet production and function in nonhuman primates. *Blood* 88, 511–521.
- Harrison, D.E., and Zhong, R.K. (1992). The same exhaustible multilineage precursor produces both myeloid and lymphoid cells as early as 3-4 weeks after marrow transplantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10134–10138.
- He, X., Chen, Z., Jiang, Y., Qiu, X., and Zhao, X. (2013). Different mutations of the human c-mpl gene indicate distinct haematopoietic diseases. *J Hematol Oncol* 6, 11.
- Hendry, J.H., Cai, W.B., Roberts, S.A., and Potten, C.S. (1997). p53 deficiency sensitizes clonogenic cells to irradiation in the large but not the small intestine. *Radiat. Res.* 148, 254–259.
- Heyer, W.-D., Li, X., Rolfsmeier, M., and Zhang, X.-P. (2006). Rad54: the Swiss Army knife of homologous recombination? *Nucleic Acids Res.* 34, 4115–4125.
- Hitchcock, I.S., Chen, M.M., King, J.R., and Kaushansky, K. (2008). YRRL motifs in the cytoplasmic domain of the thrombopoietin receptor regulate receptor internalization and degradation. *Blood* 112, 2222–2231.
- Ho, A.D. (2005). Kinetics and symmetry of divisions of hematopoietic stem cells. *Exp. Hematol.* 33, 1–8.
- Hoeijmakers, J.H.J. (2009). DNA damage, aging, and cancer. *N. Engl. J. Med.* 361, 1475–1485.
- Hofmann, W.-K., De Vos, S., Komor, M., Hoelzer, D., Wachsman, W., and Koeffler, H.P. (2002). Characterization of gene expression of CD34+ cells from normal and myelodysplastic bone marrow. *Blood* 100, 3553–3560.
- Horikawa, Y., Matsumura, I., Hashimoto, K., Shiraga, M., Kosugi, S., Tadokoro, S., Kato, T., Miyazaki, H., Tomiyama, Y., Kurata, Y., et al. (1997). Markedly reduced expression of platelet c-mpl receptor in essential thrombocythemia. *Blood* 90, 4031–4038.

Hosokawa, K., Arai, F., Yoshihara, H., Iwasaki, H., Hembree, M., Yin, T., Nakamura, Y., Gomei, Y., Takubo, K., Shiama, H., et al. (2010). Cadherin-based adhesion is a potential target for niche manipulation to protect hematopoietic stem cells in adult bone marrow. *Cell Stem Cell* 6, 194–198.

Huang, L.J., Constantinescu, S.N., and Lodish, H.F. (2001). The N-terminal domain of Janus kinase 2 is required for Golgi processing and cell surface expression of erythropoietin receptor. *Mol. Cell* 8, 1327–1338.

Huang, Y., Zhang, J., McHenry, K.T., Kim, M.M., Zeng, W., Lopez-Pajares, V., Dibble, C.C., Mizgerd, J.P., and Yuan, Z.-M. (2008). Induction of cytoplasmic accumulation of p53: a mechanism for low levels of arsenic exposure to predispose cells for malignant transformation. *Cancer Res.* 68, 9131–9136.

Huang, Y.-H., Wu, J.Y., Zhang, Y., and Wu, M.X. (2002). Synergistic and opposing regulation of the stress-responsive gene IEX-1 by p53, c-Myc, and multiple NF-kappaB/rel complexes. *Oncogene* 21, 6819–6828.

Huang, Z., Richmond, T.D., Muntean, A.G., Barber, D.L., Weiss, M.J., and Crispino, J.D. (2007). STAT1 promotes megakaryopoiesis downstream of GATA-1 in mice. *J. Clin. Invest.* 117, 3890–3899.

Hyrien, O. (2000). Mechanisms and consequences of replication fork arrest. *Biochimie* 82, 5–17.

-I-

Ihara, K., Ishii, E., Eguchi, M., Takada, H., Suminoe, A., Good, R.A., and Hara, T. (1999). Identification of mutations in the c-mpl gene in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 3132–3136.

Ira, G., and Haber, J.E. (2002). Characterization of RAD51-independent break-induced replication that acts preferentially with short homologous sequences. *Mol. Cell. Biol.* 22, 6384–6392.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Matsuoka, S., Takubo, K., Hamaguchi, I., Nomiyama, K., Hosokawa, K., Sakurada, K., Nakagata, N., et al. (2004). Regulation of oxidative stress by ATM is required for self-renewal of haematopoietic stem cells. *Nature* 431, 997–1002.

Ito, K., Hirao, A., Arai, F., Takubo, K., Matsuoka, S., Miyamoto, K., Ohmura, M., Naka, K., Hosokawa, K., Ikeda, Y., et al. (2006). Reactive oxygen species act through p38 MAPK to limit the lifespan of hematopoietic stem cells. *Nat. Med.* 12, 446–451.

-J-

Jacque, E., Tchenio, T., Piton, G., Romeo, P.-H., and Baud, V. (2005). RelA repression of RelB activity induces selective gene activation downstream of TNF receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 102, 14635–14640.

Jang, Y.-Y., and Sharkis, S.J. (2007). A low level of reactive oxygen species selects for primitive hematopoietic stem cells that may reside in the low-oxygenic niche. *Blood* 110, 3056–3063.

Javvadi, P., Makino, H., Das, A.K., Lin, Y.-F., Chen, D.J., Chen, B.P., and Nirodi, C.S. (2012). Threonine 2609 phosphorylation of the DNA-dependent protein kinase is a critical prerequisite for epidermal growth factor receptor-mediated radiation resistance. *Mol. Cancer Res.* 10, 1359–1368.

Jiang, Y., Bonig, H., Ulyanova, T., Chang, K., and Papayannopoulou, T. (2009). On the adaptation of endosteal stem cell niche function in response to stress. *Blood* 114, 3773–3782.

Jiricny, J. (2006). The multifaceted mismatch-repair system. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 7, 335–346.

Jones, R.J., Celano, P., Sharkis, S.J., and Sensenbrenner, L.L. (1989). Two phases of engraftment established by serial bone marrow transplantation in mice. *Blood* 73, 397–401.

Ju, J., Naura, A.S., Errami, Y., Zerfaoui, M., Kim, H., Kim, J.G., Abd Elmageed, Z.Y., Abdel-Mageed, A.B., Giardina, C., Beg, A.A., et al. (2010). Phosphorylation of p50 NF-kappaB at a single serine residue by DNA-dependent protein kinase is critical for VCAM-1 expression upon TNF treatment. *J. Biol. Chem.* 285, 41152–41160.

-K-

Karaghiosoff, M., Neubauer, H., Lassnig, C., Kovarik, P., Schindler, H., Pircher, H., McCoy, B., Bogdan, C., Decker, T., Brem, G., et al. (2000). Partial impairment of cytokine responses in Tyk2-deficient mice. *Immunity* 13, 549–560.

Karpova, A.Y., Trost, M., Murray, J.M., Cantley, L.C., and Howley, P.M. (2002). Interferon regulatory factor-3 is an in vivo target of DNA-PK. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 2818–2823.

Katayama, Y., Battista, M., Kao, W.-M., Hidalgo, A., Peired, A.J., Thomas, S.A., and Frenette, P.S. (2006). Signals from the sympathetic nervous system regulate hematopoietic stem cell egress from bone marrow. *Cell* 124, 407–421.

Kaushansky, K. (2009). Molecular mechanisms of thrombopoietin signaling. *J. Thromb. Haemost.* 7 *Suppl 1*, 235–238.

Kaushansky, K., Lok, S., Holly, R.D., Broudy, V.C., Lin, N., Bailey, M.C., Forstrom, J.W., Buddle, M.M., Oort, P.J., and Hagen, F.S. (1994). Promotion of megakaryocyte progenitor expansion and differentiation by the c-Mpl ligand thrombopoietin. *Nature* 369, 568–571.

Keeney, S., and Neale, M.J. (2006). Initiation of meiotic recombination by formation of DNA double-strand breaks: mechanism and regulation. *Biochem. Soc. Trans.* 34, 523–525.

Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2006). Maintaining hematopoietic stem cells in the vascular niche. *Immunity* 25, 862–864.

Kiel, M.J., and Morrison, S.J. (2008). Uncertainty in the niches that maintain haematopoietic stem cells. *Nat. Rev. Immunol.* 8, 290–301.

Kiel, M.J., Yilmaz, O.H., Iwashita, T., Yilmaz, O.H., Terhorst, C., and Morrison, S.J. (2005). SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. *Cell* 121, 1109–1121.

Kiel, M.J., Acar, M., Radice, G.L., and Morrison, S.J. (2009). Hematopoietic stem cells do not depend on N-cadherin to regulate their maintenance. *Cell Stem Cell* 4, 170–179.

Kimura, S., Roberts, A.W., Metcalf, D., and Alexander, W.S. (1998). Hematopoietic stem cell deficiencies in mice lacking c-Mpl, the receptor for thrombopoietin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 95, 1195–1200.

Kirito, K., and Kaushansky, K. (2006). Transcriptional regulation of megakaryopoiesis: thrombopoietin signaling and nuclear factors. *Curr. Opin. Hematol.* 13, 151–156.

Kobayashi, M., Laver, J.H., Kato, T., Miyazaki, H., and Ogawa, M. (1996). Thrombopoietin supports proliferation of human primitive hematopoietic cells in synergy with steel factor and/or interleukin-3. *Blood* 88, 429–436.

Kondo, M., Weissman, I.L., and Akashi, K. (1997). Identification of clonogenic common lymphoid progenitors in mouse bone marrow. *Cell* 91, 661–672.

Kondratyev, A.D., Chung, K.N., and Jung, M.O. (1996). Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Res.* 56, 1498–1502.

Kong, X., Shen, Y., Jiang, N., Fei, X., and Mi, J. (2011). Emerging roles of DNA-PK besides DNA repair. *Cell. Signal.* 23, 1273–1280.

Krause, D.S., Scadden, D.T., and Pfeffer, F.I. (2013). The hematopoietic stem cell niche--home for friend and foe? *Cytometry B Clin Cytom* 84, 7–20.

Krebs, D.L., and Hilton, D.J. (2001). SOCS proteins: negative regulators of cytokine signaling. *Stem Cells* 19, 378–387.

Kriegs, M., Kasten-Pisula, U., Rieckmann, T., Holst, K., Saker, J., Dahm-Daphi, J., and Dikomey, E. (2010). The epidermal growth factor receptor modulates DNA double-strand break repair by regulating non-homologous end-joining. *DNA Repair (Amst.)* 9, 889–897.



De Laat, W.L., Jaspers, N.G., and Hoeijmakers, J.H. (1999). Molecular mechanism of nucleotide excision repair. *Genes Dev.* 13, 768–785.

Lannutti, B.J., and Drachman, J.G. (2004). Lyn tyrosine kinase regulates thrombopoietin-induced proliferation of hematopoietic cell lines and primary megakaryocytic progenitors. *Blood* 103, 3736–3743.

Lannutti, B.J., Blake, N., Gandhi, M.J., Reems, J.A., and Drachman, J.G. (2005). Induction of polyploidization in leukemic cell lines and primary bone marrow by Src kinase inhibitor SU6656. *Blood* 105, 3875–3878.

Lannutti, B.J., Minear, J., Blake, N., and Drachman, J.G. (2006). Increased megakaryocytopoiesis in Lyn-deficient mice. *Oncogene* 25, 3316–3324.

Lapidot, T., and Petit, I. (2002). Current understanding of stem cell mobilization: the roles of chemokines, proteolytic enzymes, adhesion molecules, cytokines, and stromal cells. *Exp. Hematol.* 30, 973–981.

Lapidot, T., Dar, A., and Kollet, O. (2005). How do stem cells find their way home? *Blood* 106, 1901–1910.

Lerner, C., and Harrison, D.E. (1990). 5-Fluorouracil spares hemopoietic stem cells responsible for long-term repopulation. *Exp. Hematol.* 18, 114–118.

Lessard, J., and Sauvageau, G. (2003). Bmi-1 determines the proliferative capacity of normal and leukaemic stem cells. *Nature* 423, 255–260.

- Letourneux, C., Rocher, G., and Porteu, F. (2006). B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO J.* 25, 727–738.
- Lévesque, J.-P., Helwani, F.M., and Winkler, I.G. (2010). The endosteal “osteoblastic” niche and its role in hematopoietic stem cell homing and mobilization. *Leukemia* 24, 1979–1992.
- Li, C.L., and Johnson, G.R. (1992). Rhodamine123 reveals heterogeneity within murine Lin⁻, Sca-1⁺ hemopoietic stem cells. *J. Exp. Med.* 175, 1443–1447.
- Li, J., Spensberger, D., Ahn, J.S., Anand, S., Beer, P.A., Ghevaert, C., Chen, E., Forrai, A., Scott, L.M., Ferreira, R., et al. (2010). JAK2 V617F impairs hematopoietic stem cell function in a conditional knock-in mouse model of JAK2 V617F-positive essential thrombocythemia. *Blood* 116, 1528–1538.
- Liang, L., Deng, L., Chen, Y., Li, G.C., Shao, C., and Tischfield, J.A. (2005). Modulation of DNA end joining by nuclear proteins. *J. Biol. Chem.* 280, 31442–31449.
- Lieber, M.R. (2010). The mechanism of double-strand DNA break repair by the nonhomologous DNA end-joining pathway. *Annu. Rev. Biochem.* 79, 181–211.
- Lilly, A.J., Johnson, W.E., and Bunce, C.M. (2011). The haematopoietic stem cell niche: new insights into the mechanisms regulating haematopoietic stem cell behaviour. *Stem Cells Int* 2011, 274564.
- Lin, K.K., and Goodell, M.A. (2011). Detection of hematopoietic stem cells by flow cytometry. *Methods Cell Biol.* 103, 21–30.
- Linden, H.M., and Kaushansky, K. (2000). The glycan domain of thrombopoietin enhances its secretion. *Biochemistry* 39, 3044–3051.
- Liu, Y., Elf, S.E., Asai, T., Miyata, Y., Liu, Y., Sashida, G., Huang, G., Di Giandomenico, S., Koff, A., and Nimer, S.D. (2009). The p53 tumor suppressor protein is a critical regulator of hematopoietic stem cell behavior. *Cell Cycle* 8, 3120–3124.
- Lok, S., Kaushansky, K., Holly, R.D., Kuijper, J.L., Lofton-Day, C.E., Oort, P.J., Grant, F.J., Heipel, M.D., Burkhead, S.K., and Kramer, J.M. (1994). Cloning and expression of murine thrombopoietin cDNA and stimulation of platelet production in vivo. *Nature* 369, 565–568.
- Lord, B.I., Testa, N.G., and Hendry, J.H. (1975). The relative spatial distributions of CFUs and CFUc in the normal mouse femur. *Blood* 46, 65–72.
- Lovrić, J., Dammeier, S., Kieser, A., Mischak, H., and Kolch, W. (1998). Activated raf induces the hyperphosphorylation of stathmin and the reorganization of the microtubule network. *J. Biol. Chem.* 273, 22848–22855.
- Luckey, C.J., Bhattacharya, D., Goldrath, A.W., Weissman, I.L., Benoist, C., and Mathis, D. (2006). Memory T and memory B cells share a transcriptional program of self-renewal with long-term hematopoietic stem cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 103, 3304–3309.
- Lyman, S.D., and Jacobsen, S.E. (1998). c-kit ligand and Flt3 ligand: stem/progenitor cell factors with overlapping yet distinct activities. *Blood* 91, 1101–1134.
- Lymperi, S., Ersek, A., Ferraro, F., Dazzi, F., and Horwood, N.J. (2011). Inhibition of osteoclast function reduces hematopoietic stem cell numbers in vivo. *Blood* 117, 1540–1549.

- Ma, Y., Pannicke, U., Lu, H., Niewolik, D., Schwarz, K., and Lieber, M.R. (2005). The DNA-dependent protein kinase catalytic subunit phosphorylation sites in human Artemis. *J. Biol. Chem.* **280**, 33839–33846.
- Maillard, I., Koch, U., Dumortier, A., Shestova, O., Xu, L., Sai, H., Pross, S.E., Aster, J.C., Bhandoola, A., Radtke, F., et al. (2008). Canonical notch signaling is dispensable for the maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **2**, 356–366.
- Majeti, R., Park, C.Y., and Weissman, I.L. (2007). Identification of a hierarchy of multipotent hematopoietic progenitors in human cord blood. *Cell Stem Cell* **1**, 635–645.
- Mankan, A.K., Canli, O., Schwitalla, S., Ziegler, P., Tschopp, J., Korn, T., and Greten, F.R. (2011). TNF- α -dependent loss of IKK β -deficient myeloid progenitors triggers a cytokine loop culminating in granulocytosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **108**, 6567–6572.
- Mansour, A., Abou-Ezzi, G., Sitnicka, E., Jacobsen, S.E.W., Wakkach, A., and Blin-Wakkach, C. (2012). Osteoclasts promote the formation of hematopoietic stem cell niches in the bone marrow. *J. Exp. Med.* **209**, 537–549.
- Maserati, E., Panarello, C., Morerio, C., Valli, R., Pressato, B., Patitucci, F., Tassano, E., Di Cesare-Merlone, A., Cugno, C., Balduini, C.L., et al. (2008). Clonal chromosome anomalies and propensity to myeloid malignancies in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia (OMIM 604498). *Haematologica* **93**, 1271–1273.
- Matsumoto, A., Takeishi, S., Kanie, T., Susaki, E., Onoyama, I., Tateishi, Y., Nakayama, K., and Nakayama, K.I. (2011). p57 is required for quiescence and maintenance of adult hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* **9**, 262–271.
- Mazurier, F., Doedens, M., Gan, O.I., and Dick, J.E. (2003). Rapid myeloerythroid repopulation after intrafemoral transplantation of NOD-SCID mice reveals a new class of human stem cells. *Nat. Med.* **9**, 959–963.
- McCarty, J.M., Sprugel, K.H., Fox, N.E., Sabath, D.E., and Kaushansky, K. (1995). Murine thrombopoietin mRNA levels are modulated by platelet count. *Blood* **86**, 3668–3675.
- McCubrey, J.A., Steelman, L.S., Chappell, W.H., Abrams, S.L., Wong, E.W.T., Chang, F., Lehmann, B., Terrian, D.M., Milella, M., Tafuri, A., et al. (2007). Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1773**, 1263–1284.
- Meek, D.W. (2009). Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nat. Rev. Cancer* **9**, 714–723.
- Meijne, E.I., Van der Winden-van Groenewegen, R.J., Ploemacher, R.E., Vos, O., David, J.A., and Huiskamp, R. (1991). The effects of x-irradiation on hematopoietic stem cell compartments in the mouse. *Exp. Hematol.* **19**, 617–623.
- Melemed, A.S., Ryder, J.W., and Vik, T.A. (1997). Activation of the mitogen-activated protein kinase pathway is involved in and sufficient for megakaryocytic differentiation of CMK cells. *Blood* **90**, 3462–3470.

Méndez-Ferrer, S., Lucas, D., Battista, M., and Frenette, P.S. (2008). Haematopoietic stem cell release is regulated by circadian oscillations. *Nature* 452, 442–447.

Menezo, Y., Jr, Russo, G., Tosti, E., El Mouatassim, S., and Benkhalifa, M. (2007). Expression profile of genes coding for DNA repair in human oocytes using pangenomic microarrays, with a special focus on ROS linked decays. *J. Assist. Reprod. Genet.* 24, 513–520.

Metcalf, D. (2008). Hematopoietic cytokines. *Blood* 111, 485–491.

Metcalf, D., Willson, T.A., Hilton, D.J., Di Rago, L., and Mifsud, S. (1995). Production of hematopoietic regulatory factors in cultures of adult and fetal mouse organs: measurement by specific bioassays. *Leukemia* 9, 1556–1564.

Methia, N., Louache, F., Vainchenker, W., and Wendling, F. (1993). Oligodeoxynucleotides antisense to the proto-oncogene c-mpl specifically inhibit in vitro megakaryocytopoiesis. *Blood* 82, 1395–1401.

Milsom, M.D., Lee, A.W., Zheng, Y., and Cancelas, J.A. (2009). Fanca-/- hematopoietic stem cells demonstrate a mobilization defect which can be overcome by administration of the Rac inhibitor NSC23766. *Haematologica* 94, 1011–1015.

Milyavsky, M., Gan, O.I., Trottier, M., Komosa, M., Tabach, O., Notta, F., Lechman, E., Hermans, K.G., Eppert, K., Konovalova, Z., et al. (2010). A distinctive DNA damage response in human hematopoietic stem cells reveals an apoptosis-independent role for p53 in self-renewal. *Cell Stem Cell* 7, 186–197.

Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B.J., Miyazaki, H., Handa, M., Ohashi, H., and Ikeda, Y. (1996). Thrombopoietin induces tyrosine phosphorylation of Stat3 and Stat5 in human blood platelets. *Blood* 87, 439–446.

Miyakawa, Y., Oda, A., Druker, B.J., Ozaki, K., Handa, M., Ohashi, H., and Ikeda, Y. (1997). Thrombopoietin and thrombin induce tyrosine phosphorylation of Vav in human blood platelets. *Blood* 89, 2789–2798.

Miyakawa, Y., Drachman, J.G., Gallis, B., Kaushansky, A., and Kaushansky, K. (2000). A structure-function analysis of serine/threonine phosphorylation of the thrombopoietin receptor, c-Mpl. *J. Biol. Chem.* 275, 32214–32219.

Miyakawa, Y., Rojnuckarin, P., Habib, T., and Kaushansky, K. (2001). Thrombopoietin induces phosphoinositol 3-kinase activation through SHP2, Gab, and insulin receptor substrate proteins in BAF3 cells and primary murine megakaryocytes. *J. Biol. Chem.* 276, 2494–2502.

Miyake, T., Kung, C.K., and Goldwasser, E. (1977). Purification of human erythropoietin. *J. Biol. Chem.* 252, 5558–5564.

Miyamoto, K., Yoshida, S., Kawasumi, M., Hashimoto, K., Kimura, T., Sato, Y., Kobayashi, T., Miyauchi, Y., Hoshi, H., Iwasaki, R., et al. (2011). Osteoclasts are dispensable for hematopoietic stem cell maintenance and mobilization. *J. Exp. Med.* 208, 2175–2181.

Miyazawa, K., Williams, D.A., Gotoh, A., Nishimaki, J., Broxmeyer, H.E., and Toyama, K. (1995). Membrane-bound Steel factor induces more persistent tyrosine kinase activation and longer life span of c-kit gene-encoded protein than its soluble form. *Blood* 85, 641–649.

Mo, X., and Dynan, W.S. (2002). Subnuclear localization of Ku protein: functional association with RNA polymerase II elongation sites. *Mol. Cell. Biol.* 22, 8088–8099.

Mohrin, M., Bourke, E., Alexander, D., Warr, M.R., Barry-Holson, K., Le Beau, M.M., Morrison, C.G., and Passegué, E. (2010). Hematopoietic stem cell quiescence promotes error-prone DNA repair and mutagenesis. *Cell Stem Cell* 7, 174–185.

Mol, C.D., Parikh, S.S., Putnam, C.D., Lo, T.P., and Tainer, J.A. (1999). DNA repair mechanisms for the recognition and removal of damaged DNA bases. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* 28, 101–128.

Moliterno, A.R., Hankins, W.D., and Spivak, J.L. (1998). Impaired expression of the thrombopoietin receptor by platelets from patients with polycythemia vera. *N. Engl. J. Med.* 338, 572–580.

Morita, Y., Ema, H., and Nakauchi, H. (2010). Heterogeneity and hierarchy within the most primitive hematopoietic stem cell compartment. *J. Exp. Med.* 207, 1173–1182.

Morita, Y., Iseki, A., Okamura, S., Suzuki, S., Nakauchi, H., and Ema, H. (2011). Functional characterization of hematopoietic stem cells in the spleen. *Exp. Hematol.* 39, 351–359.e3.

Mouthon, M.-A., Van der Meeren, A., Vandamme, M., Squiban, C., and Gaugler, M.-H. (2002). Thrombopoietin protects mice from mortality and myelosuppression following high-dose irradiation: importance of time scheduling. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 80, 717–721.

Muraoka, K., Ishii, E., Tsuji, K., Yamamoto, S., Yamaguchi, H., Hara, T., Koga, H., Nakahata, T., and Miyazaki, S. (1997). Defective response to thrombopoietin and impaired expression of c-mpl mRNA of bone marrow cells in congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* 96, 287–292.

Murone, M., Carpenter, D.A., and De Sauvage, F.J. (1998). Hematopoietic deficiencies in c-mpl and TPO knockout mice. *Stem Cells* 16, 1–6.

Murphy, M.J., Wilson, A., and Trumpp, A. (2005). More than just proliferation: Myc function in stem cells. *Trends Cell Biol.* 15, 128–137.

Murray, P.J. (2007). The JAK-STAT signaling pathway: input and output integration. *J. Immunol.* 178, 2623–2629.

-N-

NAETS, J.P. (1960). The role of the kidney in erythropoiesis. *J. Clin. Invest.* 39, 102–110.

Nagata, Y., and Todokoro, K. (1995). Thrombopoietin induces activation of at least two distinct signaling pathways. *FEBS Lett.* 377, 497–501.

Naveiras, O., Nardi, V., Wenzel, P.L., Hauschka, P.V., Fahey, F., and Daley, G.Q. (2009). Bone-marrow adipocytes as negative regulators of the haematopoietic microenvironment. *Nature* 460, 259–263.

Nijnik, A., Woodbine, L., Marchetti, C., Dawson, S., Lambe, T., Liu, C., Rodrigues, N.P., Crockford, T.L., Cabuy, E., Vindigni, A., et al. (2007). DNA repair is limiting for haematopoietic stem cells during ageing. *Nature* 447, 686–690.

Nilsson, S.K., and Simmons, P.J. (2004). Transplantable stem cells: home to specific niches. *Curr. Opin. Hematol.* 11, 102–106.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., and Coverdale, J.A. (2001). Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: inferences for the localization of stem cell niches. *Blood* 97, 2293–2299.

Nilsson, S.K., Johnston, H.M., Whitty, G.A., Williams, B., Webb, R.J., Denhardt, D.T., Bertoncello, I., Bendall, L.J., Simmons, P.J., and Haylock, D.N. (2005). Osteopontin, a key component of the hematopoietic stem cell niche and regulator of primitive hematopoietic progenitor cells. *Blood* 106, 1232–1239.

Nimonkar, A.V., Genschel, J., Kinoshita, E., Polaczek, P., Campbell, J.L., Wyman, C., Modrich, P., and Kowalczykowski, S.C. (2011). BLM-DNA2-RPA-MRN and EXO1-BLM-RPA-MRN constitute two DNA end resection machineries for human DNA break repair. *Genes Dev.* 25, 350–362.

Nomura, S., Ogami, K., Kawamura, K., Tsukamoto, I., Kudo, Y., Kanakura, Y., Kitamura, Y., Miyazaki, H., and Kato, T. (1997). Cellular localization of thrombopoietin mRNA in the liver by in situ hybridization. *Exp. Hematol.* 25, 565–572.

Notta, F., Doulatov, S., Laurenti, E., Poepl, A., Jurisica, I., and Dick, J.E. (2011). Isolation of single human hematopoietic stem cells capable of long-term multilineage engraftment. *Science* 333, 218–221.

Nowak, E., Etienne, O., Millet, P., Lages, C.S., Mathieu, C., Mouthon, M.-A., and Boussin, F.D. (2006). Radiation-induced H2AX phosphorylation and neural precursor apoptosis in the developing brain of mice. *Radiat. Res.* 165, 155–164.

Nussenzweig, A., Chen, C., Da Costa Soares, V., Sanchez, M., Sokol, K., Nussenzweig, M.C., and Li, G.C. (1996). Requirement for Ku80 in growth and immunoglobulin V(D)J recombination. *Nature* 382, 551–555.

-O-

Olson, T.S., Caselli, A., Otsuru, S., Hofmann, T.J., Williams, R., Paolucci, P., Dominici, M., and Horwitz, E.M. (2013). Megakaryocytes promote murine osteoblastic HSC niche expansion and stem cell engraftment after radioablative conditioning. *Blood*.

Omatsu, Y., Sugiyama, T., Kohara, H., Kondoh, G., Fujii, N., Kohno, K., and Nagasawa, T. (2010). The essential functions of adipo-osteogenic progenitors as the hematopoietic stem and progenitor cell niche. *Immunity* 33, 387–399.

Orford, K.W., and Scadden, D.T. (2008). Deconstructing stem cell self-renewal: genetic insights into cell-cycle regulation. *Nat. Rev. Genet.* 9, 115–128.

Van Os, R., Robinson, S., Sheridan, T., and Mauch, P.M. (2000). Granulocyte-colony stimulating factor impedes recovery from damage caused by cytotoxic agents through increased differentiation at the expense of self-renewal. *Stem Cells* 18, 120–127.

Osawa, M., Hanada, K., Hamada, H., and Nakauchi, H. (1996). Long-term lymphohematopoietic reconstitution by a single CD34-low/negative hematopoietic stem cell. *Science* 273, 242–245.

-P-

Pallard, C., Gouilleux, F., Bénit, L., Cocault, L., Souyri, M., Levy, D., Groner, B., Gisselbrecht, S., and Dusanter-Fourt, I. (1995). Thrombopoietin activates a STAT5-like factor in hematopoietic cells. *EMBO J.* 14, 2847–2856.

Papayannopoulou, T. (2003). Bone marrow homing: the players, the playfield, and their evolving roles. *Curr. Opin. Hematol.* 10, 214–219.

- Parganas, E., Wang, D., Stravopodis, D., Topham, D.J., Marine, J.C., Teglund, S., Vanin, E.F., Bodner, S., Colamonici, O.R., Van Deursen, J.M., et al. (1998). Jak2 is essential for signaling through a variety of cytokine receptors. *Cell* 93, 385–395.
- Parmar, K., Kim, J., Sykes, S.M., Shimamura, A., Stuckert, P., Zhu, K., Hamilton, A., Deloach, M.K., Kutok, J.L., Akashi, K., et al. (2010). Hematopoietic stem cell defects in mice with deficiency of Fancd2 or Usp1. *Stem Cells* 28, 1186–1195.
- Passegué, E., Wagers, A.J., Giuriato, S., Anderson, W.C., and Weissman, I.L. (2005). Global analysis of proliferation and cell cycle gene expression in the regulation of hematopoietic stem and progenitor cell fates. *J. Exp. Med.* 202, 1599–1611.
- Patt, H.M., and Maloney, M.A. (1972). Bone formation and resorption as a requirement for marrow development. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 140, 205–207.
- Pawlikowska, P., Leray, I., De Laval, B., Guihard, S., Kumar, R., Rosselli, F., and Porteu, F. (2010). ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response. *Cell Death Differ.* 17, 1739–1750.
- Pecquet, C., Staerk, J., Chaligné, R., Goss, V., Lee, K.A., Zhang, X., Rush, J., Van Hees, J., Poirel, H.A., Scheiff, J.-M., et al. (2010). Induction of myeloproliferative disorder and myelofibrosis by thrombopoietin receptor W515 mutants is mediated by cytosolic tyrosine 112 of the receptor. *Blood* 115, 1037–1048.
- Pecquet, C., Diaconu, C.C., Staerk, J., Girardot, M., Marty, C., Royer, Y., Defour, J.-P., Dusa, A., Besancenot, R., Giraudier, S., et al. (2012). Thrombopoietin receptor down-modulation by JAK2 V617F: restoration of receptor levels by inhibitors of pathologic JAK2 signaling and of proteasomes. *Blood* 119, 4625–4635.
- Perrault, R., Wang, H., Wang, M., Rosidi, B., and Iliakis, G. (2004). Backup pathways of NHEJ are suppressed by DNA-PK. *J. Cell. Biochem.* 92, 781–794.
- Pestina, T.I., Cleveland, J.L., Yang, C., Zambetti, G.P., and Jackson, C.W. (2001). Mpl ligand prevents lethal myelosuppression by inhibiting p53-dependent apoptosis. *Blood* 98, 2084–2090.
- Pietras, E.M., Warr, M.R., and Passegué, E. (2011). Cell cycle regulation in hematopoietic stem cells. *J. Cell Biol.* 195, 709–720.
- Pikman, Y., Lee, B.H., Mercher, T., McDowell, E., Ebert, B.L., Gozo, M., Cuker, A., Wernig, G., Moore, S., Galinsky, I., et al. (2006). MPLW515L is a novel somatic activating mutation in myelofibrosis with myeloid metaplasia. *PLoS Med.* 3, e270.
- Plo, I., Nakatake, M., Malivert, L., De Villartay, J.-P., Giraudier, S., Villeval, J.-L., Wiesmuller, L., and Vainchenker, W. (2008). JAK2 stimulates homologous recombination and genetic instability: potential implication in the heterogeneity of myeloproliferative disorders. *Blood* 112, 1402–1412.
- Ploemacher, R.E., Van der Sluijs, J.P., Voerman, J.S., and Brons, N.H. (1989). An in vitro limiting-dilution assay of long-term repopulating hematopoietic stem cells in the mouse. *Blood* 74, 2755–2763.
- Potten, C.S. (2004). Radiation, the ideal cytotoxic agent for studying the cell biology of tissues such as the small intestine. *Radiat. Res.* 161, 123–136.

Pozner, R., and Schattner, M. (2008). TPO signaling: when the tyrosines go marching in(side). *Blood* 112, 2171–2172.

Prall, W.C., Czibere, A., Grall, F., Spentzos, D., Steidl, U., Giagounidis, A.A.N., Kuendgen, A., Otu, H., Rong, A., Libermann, T.A., et al. (2009). Differential gene expression of bone marrow-derived CD34+ cells is associated with survival of patients suffering from myelodysplastic syndrome. *Int. J. Hematol.* 89, 173–187.

Prasher, J.M., Lalai, A.S., Heijmans-Antonissen, C., Ploemacher, R.E., Hoeijmakers, J.H.J., Touw, I.P., and Niedernhofer, L.J. (2005). Reduced hematopoietic reserves in DNA interstrand crosslink repair-deficient Ercc1-/- mice. *EMBO J.* 24, 861–871.

Pulikkan, J.A., Madera, D., Xue, L., Bradley, P., Landrette, S.F., Kuo, Y.-H., Abbas, S., Zhu, L.J., Valk, P., and Castilla, L.H. (2012). Thrombopoietin/MPL participates in initiating and maintaining RUNX1-ETO acute myeloid leukemia via PI3K/AKT signaling. *Blood* 120, 868–879.

Puri, M.C., and Bernstein, A. (2003). Requirement for the TIE family of receptor tyrosine kinases in adult but not fetal hematopoiesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 12753–12758.

-Q-

Qian, H., Buza-Vidas, N., Hyland, C.D., Jensen, C.T., Antonchuk, J., Månsson, R., Thoren, L.A., Ekblom, M., Alexander, W.S., and Jacobsen, S.E.W. (2007). Critical role of thrombopoietin in maintaining adult quiescent hematopoietic stem cells. *Cell Stem Cell* 1, 671–684.

Qing, Y., Lin, Y., and Gerson, S.L. (2012). An intrinsic BM hematopoietic niche occupancy defect of HSC in scid mice facilitates exogenous HSC engraftment. *Blood* 119, 1768–1771.

-R-

Racke, F.K., Lewandowska, K., Goueli, S., and Goldfarb, A.N. (1997). Sustained activation of the extracellular signal-regulated kinase/mitogen-activated protein kinase pathway is required for megakaryocytic differentiation of K562 cells. *J. Biol. Chem.* 272, 23366–23370.

Radtke, F., Wilson, A., Mancini, S.J.C., and MacDonald, H.R. (2004). Notch regulation of lymphocyte development and function. *Nat. Immunol.* 5, 247–253.

Ragimbeau, J., Dondi, E., Alcover, A., Eid, P., Uzé, G., and Pellegrini, S. (2003). The tyrosine kinase Tyk2 controls IFNAR1 cell surface expression. *EMBO J.* 22, 537–547.

Rajagopalan, S., Moyle, M.W., Joosten, I., and Long, E.O. (2010). DNA-PKcs controls an endosomal signaling pathway for a proinflammatory response by natural killer cells. *Sci Signal* 3, ra14.

Randall, T.D., and Weissman, I.L. (1997). Phenotypic and functional changes induced at the clonal level in hematopoietic stem cells after 5-fluorouracil treatment. *Blood* 89, 3596–3606.

Rass, E., Grabarz, A., Bertrand, P., and Lopez, B.-S. (2012). [Double strand break repair, one mechanism can hide another: alternative non-homologous end joining]. *Cancer Radiother* 16, 1–10.

Rassool, F.V. (2003). DNA double strand breaks (DSB) and non-homologous end joining (NHEJ) pathways in human leukemia. *Cancer Lett.* 193, 1–9.

Ratajczak, J., Machalinski, B., Majka, M., Kijowski, J., Marlicz, W., Rozmyslowicz, T., Ostrowski, M., and Ratajczak, M.Z. (1999). Evidence that human haematopoietic stem cells (HSC) do not reside within the CD34+KIT- cell population. *Ann. Transplant.* 4, 22–30.

Raza, A., and Galili, N. (2012). The genetic basis of phenotypic heterogeneity in myelodysplastic syndromes. *Nat. Rev. Cancer* 12, 849–859.

Renner, F., Moreno, R., and Schmitz, M.L. (2010). SUMOylation-dependent localization of IKKepsilon in PML nuclear bodies is essential for protection against DNA-damage-triggered cell death. *Mol. Cell* 37, 503–515.

Riley, T., Sontag, E., Chen, P., and Levine, A. (2008). Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 402–412.

Robb, L. (2007). Cytokine receptors and hematopoietic differentiation. *Oncogene* 26, 6715–6723.

Rocher, G., Letourneux, C., Lenormand, P., and Porteu, F. (2007). Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J. Biol. Chem.* 282, 5468–5477.

Rogakou, E.P., Boon, C., Redon, C., and Bonner, W.M. (1999). Megabase chromatin domains involved in DNA double-strand breaks in vivo. *J. Cell Biol.* 146, 905–916.

Rojnuckarin, P., Drachman, J.G., and Kaushansky, K. (1999). Thrombopoietin-induced activation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in normal megakaryocytes: role in endomitosis. *Blood* 94, 1273–1282.

Rossi, D.J., Seita, J., Czechowicz, A., Bhattacharya, D., Bryder, D., and Weissman, I.L. (2007). Hematopoietic stem cell quiescence attenuates DNA damage response and permits DNA damage accumulation during aging. *Cell Cycle* 6, 2371–2376.

Roth, D.B., Porter, T.N., and Wilson, J.H. (1985). Mechanisms of nonhomologous recombination in mammalian cells. *Mol. Cell. Biol.* 5, 2599–2607.

Rothkamm, K., Krüger, I., Thompson, L.H., and Löbrich, M. (2003). Pathways of DNA double-strand break repair during the mammalian cell cycle. *Mol. Cell. Biol.* 23, 5706–5715.

Rouyez, M.C., Boucheron, C., Gisselbrecht, S., Dusanter-Fourt, I., and Porteu, F. (1997). Control of thrombopoietin-induced megakaryocytic differentiation by the mitogen-activated protein kinase pathway. *Mol. Cell. Biol.* 17, 4991–5000.

Rouyez, M.-C., Lestingi, M., Charon, M., Fichelson, S., Buzyn, A., and Dusanter-Fourt, I. (2005). IFN regulatory factor-2 cooperates with STAT1 to regulate transporter associated with antigen processing-1 promoter activity. *J. Immunol.* 174, 3948–3958.

Royer, Y., Staerk, J., Costuleanu, M., Courtoy, P.J., and Constantinescu, S.N. (2005). Janus kinases affect thrombopoietin receptor cell surface localization and stability. *J. Biol. Chem.* 280, 27251–27261.

Ruzankina, Y., Pinzon-Guzman, C., Asare, A., Ong, T., Pontano, L., Cotsarelis, G., Zediak, V.P., Velez, M., Bhandoola, A., and Brown, E.J. (2007). Deletion of the developmentally essential gene ATR in adult mice leads to age-related phenotypes and stem cell loss. *Cell Stem Cell* 1, 113–126.

Ryan, P.J., Willson, T., Alexander, W.S., Di Rago, L., Mifsud, S., and Metcalf, D. (2001). The multi-organ origin of interleukin-5 in the mouse. *Leukemia* 15, 1248–1255.

-S-

Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P.G., Riminucci, M., et al. (2007). Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell* 131, 324–336.

Saintigny, Y., Delacôte, F., Varès, G., Petitot, F., Lambert, S., Averbeck, D., and Lopez, B.S. (2001). Characterization of homologous recombination induced by replication inhibition in mammalian cells. *EMBO J.* 20, 3861–3870.

Sallmyr, A., Tomkinson, A.E., and Rassool, F.V. (2008). Up-regulation of WRN and DNA ligase IIIalpha in chronic myeloid leukemia: consequences for the repair of DNA double-strand breaks. *Blood* 112, 1413–1423.

Sancar, A., Lindsey-Boltz, L.A., Unsal-Kaçmaz, K., and Linn, S. (2004). Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage checkpoints. *Annu. Rev. Biochem.* 73, 39–85.

Santamaría, C., Ramos, F., Puig, N., Barragán, E., De Paz, R., Pedro, C., Insunza, A., Tormo, M., Del Cañizo, C., Díez-Campelo, M., et al. (2012). Simultaneous analysis of the expression of 14 genes with individual prognostic value in myelodysplastic syndrome patients at diagnosis: WT1 detection in peripheral blood adversely affects survival. *Ann. Hematol.* 91, 1887–1895.

Sartori, A.A., Lukas, C., Coates, J., Mistrik, M., Fu, S., Bartek, J., Baer, R., Lukas, J., and Jackson, S.P. (2007). Human CtIP promotes DNA end resection. *Nature* 450, 509–514.

Sattler, M., Durstin, M.A., Frank, D.A., Okuda, K., Kaushansky, K., Salgia, R., and Griffin, J.D. (1995). The thrombopoietin receptor c-MPL activates JAK2 and TYK2 tyrosine kinases. *Exp. Hematol.* 23, 1040–1048.

Saulnier, N., Guihard, S., Holy, X., Decembre, E., Jurdic, P., Clay, D., Feuillet, V., Pagès, G., Pouysségur, J., Porteu, F., et al. (2012). ERK1 regulates the hematopoietic stem cell niches. *PLoS ONE* 7, e30788.

Saur, S.J., Sangkhae, V., Geddis, A.E., Kaushansky, K., and Hitchcock, I.S. (2010). Ubiquitination and degradation of the thrombopoietin receptor c-Mpl. *Blood* 115, 1254–1263.

De Sauvage, F.J., Hass, P.E., Spencer, S.D., Malloy, B.E., Gurney, A.L., Spencer, S.A., Darbonne, W.C., Henzel, W.J., Wong, S.C., and Kuang, W.J. (1994). Stimulation of megakaryocytopoiesis and thrombopoiesis by the c-Mpl ligand. *Nature* 369, 533–538.

De Sauvage, F.J., Carver-Moore, K., Luoh, S.M., Ryan, A., Dowd, M., Eaton, D.L., and Moore, M.W. (1996). Physiological regulation of early and late stages of megakaryocytopoiesis by thrombopoietin. *J. Exp. Med.* 183, 651–656.

Savic, V., Yin, B., Maas, N.L., Bredemeyer, A.L., Carpenter, A.C., Helmink, B.A., Yang-Iott, K.S., Sleckman, B.P., and Bassing, C.H. (2009). Formation of dynamic gamma-H2AX domains along broken DNA strands is distinctly regulated by ATM and MDC1 and dependent upon H2AX densities in chromatin. *Mol. Cell* 34, 298–310.

Sawada, M., Sun, W., Hayes, P., Leskov, K., Boothman, D.A., and Matsuyama, S. (2003). Ku70 suppresses the apoptotic translocation of Bax to mitochondria. *Nat. Cell Biol.* 5, 320–329.

Schäfer, H., Diebel, J., Arlt, A., Trauzold, A., and Schmidt, W.E. (1998). The promoter of human p22/PACAP response gene 1 (PRG1) contains functional binding sites for the p53 tumor suppressor and for NFkappaB. *FEBS Lett.* 436, 139–143.

Scheller, M., Huelsken, J., Rosenbauer, F., Taketo, M.M., Birchmeier, W., Tenen, D.G., and Leutz, A. (2006). Hematopoietic stem cell and multilineage defects generated by constitutive beta-catenin activation. *Nat. Immunol.* 7, 1037–1047.

Schofield, R. (1978). The relationship between the spleen colony-forming cell and the haemopoietic stem cell. *Blood Cells* 4, 7–25.

Schulze, H., Ballmaier, M., Welte, K., and Germeshausen, M. (2000). Thrombopoietin induces the generation of distinct Stat1, Stat3, Stat5a and Stat5b homo- and heterodimeric complexes with different kinetics in human platelets. *Exp. Hematol.* 28, 294–304.

Segev, D.L., Ha, T.U., Tran, T.T., Kenneally, M., Harkin, P., Jung, M., MacLaughlin, D.T., Donahoe, P.K., and Maheswaran, S. (2000). Mullerian inhibiting substance inhibits breast cancer cell growth through an NFkappa B-mediated pathway. *J. Biol. Chem.* 275, 28371–28379.

Seita, J., Ema, H., Ooehara, J., Yamazaki, S., Tadokoro, Y., Yamasaki, A., Eto, K., Takaki, S., Takatsu, K., and Nakauchi, H. (2007). Lnk negatively regulates self-renewal of hematopoietic stem cells by modifying thrombopoietin-mediated signal transduction. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104, 2349–2354.

Séverin, S., Ghevaert, C., and Mazharian, A. (2010). The mitogen-activated protein kinase signaling pathways: role in megakaryocyte differentiation. *J. Thromb. Haemost.* 8, 17–26.

Shao, L., Li, H., Pazhanisamy, S.K., Meng, A., Wang, Y., and Zhou, D. (2011). Reactive oxygen species and hematopoietic stem cell senescence. *Int. J. Hematol.* 94, 24–32.

Shao, L., Feng, W., Lee, K.-J., Chen, B.P.C., and Zhou, D. (2012). A sensitive and quantitative polymerase chain reaction-based cell free in vitro non-homologous end joining assay for hematopoietic stem cells. *PLoS ONE* 7, e33499.

Shen, L., Guo, J., Santos-Berrios, C., and Wu, M.X. (2006). Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J. Biol. Chem.* 281, 15304–15311.

Sibanda, B.L., Chirgadze, D.Y., and Blundell, T.L. (2010). Crystal structure of DNA-PKcs reveals a large open-ring cradle comprised of HEAT repeats. *Nature* 463, 118–121.

Sibani, S., Price, G.B., and Zannis-Hadjopoulos, M. (2005). Ku80 binds to human replication origins prior to the assembly of the ORC complex. *Biochemistry* 44, 7885–7896.

Sieburg, H.B., Cho, R.H., Dykstra, B., Uchida, N., Eaves, C.J., and Muller-Sieburg, C.E. (2006). The hematopoietic stem compartment consists of a limited number of discrete stem cell subsets. *Blood* 107, 2311–2316.

Simonnet, A.J., Nehmé, J., Vaigot, P., Barroca, V., Leboulch, P., and Tronik-Le Roux, D. (2009). Phenotypic and functional changes induced in hematopoietic stem/progenitor cells after gamma-ray radiation exposure. *Stem Cells* 27, 1400–1409.

- Sipkins, D.A., Wei, X., Wu, J.W., Runnels, J.M., Côté, D., Means, T.K., Luster, A.D., Scadden, D.T., and Lin, C.P. (2005). In vivo imaging of specialized bone marrow endothelial microdomains for tumour engraftment. *Nature* 435, 969–973.
- Sitnicka, E., Lin, N., Priestley, G.V., Fox, N., Broudy, V.C., Wolf, N.S., and Kaushansky, K. (1996). The effect of thrombopoietin on the proliferation and differentiation of murine hematopoietic stem cells. *Blood* 87, 4998–5005.
- Slupianek, A., Hoser, G., Majsterek, I., Bronisz, A., Malecki, M., Blasiak, J., Fishel, R., and Skorski, T. (2002). Fusion tyrosine kinases induce drug resistance by stimulation of homology-dependent recombination repair, prolongation of G(2)/M phase, and protection from apoptosis. *Mol. Cell. Biol.* 22, 4189–4201.
- Snow, J.W., Abraham, N., Ma, M.C., Abbey, N.W., Herndier, B., and Goldsmith, M.A. (2002). STAT5 promotes multilineage hematolymphoid development in vivo through effects on early hematopoietic progenitor cells. *Blood* 99, 95–101.
- Solar, G.P., Kerr, W.G., Zeigler, F.C., Hess, D., Donahue, C., De Sauvage, F.J., and Eaton, D.L. (1998). Role of c-mpl in early hematopoiesis. *Blood* 92, 4–10.
- Solinger, J.A., Kiianitsa, K., and Heyer, W.-D. (2002). Rad54, a Swi2/Snf2-like recombinational repair protein, disassembles Rad51:dsDNA filaments. *Mol. Cell* 10, 1175–1188.
- Souyri, M., Vigon, I., Penciolelli, J.F., Heard, J.M., Tambourin, P., and Wendling, F. (1990). A putative truncated cytokine receptor gene transduced by the myeloproliferative leukemia virus immortalizes hematopoietic progenitors. *Cell* 63, 1137–1147.
- Spangrude, G.J., Heimfeld, S., and Weissman, I.L. (1988). Purification and characterization of mouse hematopoietic stem cells. *Science* 241, 58–62.
- Sperka, T., Wang, J., and Rudolph, K.L. (2012). DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 579–590.
- Staerk, J., Lacout, C., Sato, T., Smith, S.O., Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2006a). An amphipathic motif at the transmembrane-cytoplasmic junction prevents autonomous activation of the thrombopoietin receptor. *Blood* 107, 1864–1871.
- Steele, M., Hitzler, J., Doyle, J.J., Germeshausen, M., Fernandez, C.V., Yuille, K., and Dror, Y. (2005). Reduced intensity hematopoietic stem-cell transplantation across human leukocyte antigen barriers in a patient with congenital amegakaryocytic thrombocytopenia and monosomy 7. *Pediatr Blood Cancer* 45, 212–216.
- Stefanich, E.G., Carlson-Zermeno, C.C., McEvoy, K., Reich, M., and Fielder, P.J. (2001). Dose schedule of recombinant murine thrombopoietin prior to myelosuppressive and myeloablative therapy in mice. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 47, 70–77.
- Stein, S.J., and Baldwin, A.S. (2013). Deletion of the NF- κ B subunit p65/RelA in the hematopoietic compartment leads to defects in hematopoietic stem cell function. *Blood*.
- Stephens, P.J., McBride, D.J., Lin, M.-L., Varela, I., Pleasance, E.D., Simpson, J.T., Stebbings, L.A., Leroy, C., Edkins, S., Mudie, L.J., et al. (2009). Complex landscapes of somatic rearrangement in human breast cancer genomes. *Nature* 462, 1005–1010.

Stier, S., Ko, Y., Forkert, R., Lutz, C., Neuhaus, T., Grünewald, E., Cheng, T., Dombkowski, D., Calvi, L.M., Rittling, S.R., et al. (2005). Osteopontin is a hematopoietic stem cell niche component that negatively regulates stem cell pool size. *J. Exp. Med.* *201*, 1781–1791.

Sung, P., and Klein, H. (2006). Mechanism of homologous recombination: mediators and helicases take on regulatory functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 739–750.

Sungaran, R., Markovic, B., and Chong, B.H. (1997a). Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* *89*, 101–107.

Sungaran, R., Markovic, B., and Chong, B.H. (1997b). Localization and regulation of thrombopoietin mRNA expression in human kidney, liver, bone marrow, and spleen using in situ hybridization. *Blood* *89*, 101–107.

Sutherland, H.J., Eaves, C.J., Eaves, A.C., Dragowska, W., and Lansdorp, P.M. (1989). Characterization and partial purification of human marrow cells capable of initiating long-term hematopoiesis in vitro. *Blood* *74*, 1563–1570.

Svendsen, J.M., and Harper, J.W. (2010). GEN1/Yen1 and the SLX4 complex: Solutions to the problem of Holliday junction resolution. *Genes Dev.* *24*, 521–536.

Sy, S.M.H., Huen, M.S.Y., and Chen, J. (2009). PALB2 is an integral component of the BRCA complex required for homologous recombination repair. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *106*, 7155–7160.

T-

Taichman, R.S., and Emerson, S.G. (1998). The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells* *16*, 7–15.

Taichman, R.S., Reilly, M.J., and Emerson, S.G. (2000). The Hematopoietic Microenvironment: Osteoblasts and The Hematopoietic Microenvironment. *Hematology* *4*, 421–426.

Takano, H., Ema, H., Sudo, K., and Nakauchi, H. (2004). Asymmetric division and lineage commitment at the level of hematopoietic stem cells: inference from differentiation in daughter cell and granddaughter cell pairs. *J. Exp. Med.* *199*, 295–302.

Taniguchi, H., Toyoshima, T., Fukao, K., and Nakauchi, H. (1996). Presence of hematopoietic stem cells in the adult liver. *Nat. Med.* *2*, 198–203.

Terstappen, L.W., Huang, S., Safford, M., Lansdorp, P.M., and Loken, M.R. (1991). Sequential generations of hematopoietic colonies derived from single nonlineage-committed CD34+CD38-progenitor cells. *Blood* *77*, 1218–1227.

Thorén, L.A., Liuba, K., Bryder, D., Nygren, J.M., Jensen, C.T., Qian, H., Antonchuk, J., and Jacobsen, S.-E.W. (2008). Kit regulates maintenance of quiescent hematopoietic stem cells. *J. Immunol.* *180*, 2045–2053.

Tijssen, M.R., Di Summa, F., Van den Oudenrijn, S., Zwaginga, J.J., Van der Schoot, C.E., Voermans, C., and De Haas, M. (2008). Functional analysis of single amino-acid mutations in the thrombopoietin-receptor Mpl underlying congenital amegakaryocytic thrombocytopenia. *Br. J. Haematol.* *141*, 808–813.

TILL, J.E., and McCULLOCH, E.A. (1961). A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.* **14**, 213–222.

Tobin, L.A., Robert, C., Rapoport, A.P., Gojo, I., Baer, M.R., Tomkinson, A.E., and Rassool, F.V. (2013). Targeting abnormal DNA double-strand break repair in tyrosine kinase inhibitor-resistant chronic myeloid leukemias. *Oncogene* **32**, 1784–1793.

Tong, W., and Lodish, H.F. (2004). Lnk inhibits Tpo-mpl signaling and Tpo-mediated megakaryocytopoiesis. *J. Exp. Med.* **200**, 569–580.

Toulany, M., Kehlbach, R., Florczak, U., Sak, A., Wang, S., Chen, J., Lobrich, M., and Rodemann, H.P. (2008). Targeting of AKT1 enhances radiation toxicity of human tumor cells by inhibiting DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Ther.* **7**, 1772–1781.

Toulany, M., Lee, K.-J., Fattah, K.R., Lin, Y.-F., Fehrenbacher, B., Schaller, M., Chen, B.P., Chen, D.J., and Rodemann, H.P. (2012). Akt promotes post-irradiation survival of human tumor cells through initiation, progression, and termination of DNA-PKcs-dependent DNA double-strand break repair. *Mol. Cancer Res.* **10**, 945–957.

Tsai, C.J., Kim, S.A., and Chu, G. (2007). Cernunnos/XLF promotes the ligation of mismatched and noncohesive DNA ends. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**, 7851–7856.

Tsuji-Takayama, K., Tahata, H., Harashima, A., Nishida, Y., Izumi, N., Fukuda, S., Ohta, T., and Kurimoto, M. (1996). Interferon-gamma enhances megakaryocyte colony-stimulating activity in murine bone marrow cells. *J. Interferon Cytokine Res.* **16**, 701–708.

Tzeng, Y.-S., Li, H., Kang, Y.-L., Chen, W.-C., Cheng, W.-C., and Lai, D.-M. (2011). Loss of Cxcl12/Sdf-1 in adult mice decreases the quiescent state of hematopoietic stem/progenitor cells and alters the pattern of hematopoietic regeneration after myelosuppression. *Blood* **117**, 429–439.

-V-

Vainchenker, W., and Constantinescu, S.N. (2012). JAK/STAT signaling in hematological malignancies. *Oncogene*.

Varnum-Finney, B., Xu, L., Brashem-Stein, C., Nourigat, C., Flowers, D., Bakkour, S., Pear, W.S., and Bernstein, I.D. (2000). Pluripotent, cytokine-dependent, hematopoietic stem cells are immortalized by constitutive Notch1 signaling. *Nat. Med.* **6**, 1278–1281.

Varnum-Finney, B., Halasz, L.M., Sun, M., Gridley, T., Radtke, F., and Bernstein, I.D. (2011). Notch2 governs the rate of generation of mouse long- and short-term repopulating stem cells. *J. Clin. Invest.* **121**, 1207–1216.

Venezia, T.A., Merchant, A.A., Ramos, C.A., Whitehouse, N.L., Young, A.S., Shaw, C.A., and Goodell, M.A. (2004). Molecular signatures of proliferation and quiescence in hematopoietic stem cells. *PLoS Biol.* **2**, e301.

Verkaik, N.S., Esveldt-van Lange, R.E.E., Van Heemst, D., Brüggewirth, H.T., Hoeijmakers, J.H.J., Zdzienicka, M.Z., and Van Gent, D.C. (2002). Different types of V(D)J recombination and end-joining defects in DNA double-strand break repair mutant mammalian cells. *Eur. J. Immunol.* **32**, 701–709.

Verstegen, M.M.A., Wognum, A.W., and Wagemaker, G. (2003). Thrombopoietin is a major limiting factor for selective outgrowth of human umbilical cord blood cells in non-obese diabetic/severe combined immunodeficient recipient mice. *Br. J. Haematol.* **122**, 837–846.

Vigon, I., Mornon, J.P., Cocault, L., Mitjavila, M.T., Tambourin, P., Gisselbrecht, S., and Souyri, M. (1992). Molecular cloning and characterization of MPL, the human homolog of the v-mpl oncogene: identification of a member of the hematopoietic growth factor receptor superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **89**, 5640–5644.

Vigon, I., Dreyfus, F., Melle, J., Viguié, F., Ribrag, V., Cocault, L., Souyri, M., and Gisselbrecht, S. (1993). Expression of the c-mpl proto-oncogene in human hematologic malignancies. *Blood* **82**, 877–883.

Visnjic, D., Kalajzic, Z., Rowe, D.W., Katavic, V., Lorenzo, J., and Aguila, H.L. (2004). Hematopoiesis is severely altered in mice with an induced osteoblast deficiency. *Blood* **103**, 3258–3264.

-W-

Wagemaker, G., Neelis, K.J., Hartong, S.C., Wognum, A.W., Thomas, G.R., Fielder, P.J., and Eaton, D.L. (1998). The efficacy of recombinant thrombopoietin in murine and nonhuman primate models for radiation-induced myelosuppression and stem cell transplantation. *Stem Cells* **16**, 375–386.

Wang, B., Nichol, J.L., and Sullivan, J.T. (2004). Pharmacodynamics and pharmacokinetics of AMG 531, a novel thrombopoietin receptor ligand. *Clin. Pharmacol. Ther.* **76**, 628–638.

Wang, H., Zeng, Z.C., Bui, T.A., Sonoda, E., Takata, M., Takeda, S., and Iliakis, G. (2001). Efficient rejoining of radiation-induced DNA double-strand breaks in vertebrate cells deficient in genes of the RAD52 epistasis group. *Oncogene* **20**, 2212–2224.

Wang, H., Perrault, A.R., Takeda, Y., Qin, W., Wang, H., and Iliakis, G. (2003). Biochemical evidence for Ku-independent backup pathways of NHEJ. *Nucleic Acids Res.* **31**, 5377–5388.

Wang, J., Sun, Q., Morita, Y., Jiang, H., Gross, A., Lechel, A., Hildner, K., Guachalla, L.M., Gompf, A., Hartmann, D., et al. (2012). A differentiation checkpoint limits hematopoietic stem cell self-renewal in response to DNA damage. *Cell* **148**, 1001–1014.

Wang, M., Wu, W., Wu, W., Rosidi, B., Zhang, L., Wang, H., and Iliakis, G. (2006). PARP-1 and Ku compete for repair of DNA double strand breaks by distinct NHEJ pathways. *Nucleic Acids Res.* **34**, 6170–6182.

Wang, Q., Gao, F., Wang, T., Flagg, T., and Deng, X. (2009). A nonhomologous end-joining pathway is required for protein phosphatase 2A promotion of DNA double-strand break repair. *Neoplasia* **11**, 1012–1021.

Wang, Y., Liu, L., Pazhanisamy, S.K., Li, H., Meng, A., and Zhou, D. (2010). Total body irradiation causes residual bone marrow injury by induction of persistent oxidative stress in murine hematopoietic stem cells. *Free Radic. Biol. Med.* **48**, 348–356.

Watowich, S.S., Wu, H., Socolovsky, M., Klingmuller, U., Constantinescu, S.N., and Lodish, H.F. (1996). Cytokine receptor signal transduction and the control of hematopoietic cell development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **12**, 91–128.

Wendling, F., and Vainchenker, W. (1998). Thrombopoietin and its receptor. *Eur. Cytokine Netw.* **9**, 221–231.

Wendling, F., Varlet, P., Charon, M., and Tambourin, P. (1986). MPLV: a retrovirus complex inducing an acute myeloproliferative leukemic disorder in adult mice. *Virology* **149**, 242–246.

- West, S.C. (2003). Molecular views of recombination proteins and their control. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 435–445.
- Wicke, D.C., Meyer, J., Buesche, G., Heckl, D., Kreipe, H., Li, Z., Welte, K.H., Ballmaier, M., Baum, C., and Modlich, U. (2010). Gene therapy of MPL deficiency: challenging balance between leukemia and pancytopenia. *Mol. Ther.* **18**, 343–352.
- Wiestner, A., Schlemper, R.J., Van der Maas, A.P., and Skoda, R.C. (1998). An activating splice donor mutation in the thrombopoietin gene causes hereditary thrombocythaemia. *Nat. Genet.* **18**, 49–52.
- Wilson, A., and Trumpp, A. (2006). Bone-marrow haematopoietic-stem-cell niches. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 93–106.
- Wilson, A., Murphy, M.J., Oskarsson, T., Kaloulis, K., Bettess, M.D., Oser, G.M., Pasche, A.-C., Knabenhans, C., Macdonald, H.R., and Trumpp, A. (2004). c-Myc controls the balance between hematopoietic stem cell self-renewal and differentiation. *Genes Dev.* **18**, 2747–2763.
- Wilson, A., Laurenti, E., Oser, G., Van der Wath, R.C., Blanco-Bose, W., Jaworski, M., Offner, S., Dunant, C.F., Eshkind, L., Bockamp, E., et al. (2008). Hematopoietic stem cells reversibly switch from dormancy to self-renewal during homeostasis and repair. *Cell* **135**, 1118–1129.
- Wilson, A., Laurenti, E., and Trumpp, A. (2009). Balancing dormant and self-renewing hematopoietic stem cells. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **19**, 461–468.
- Winkler, I.G., Sims, N.A., Pettit, A.R., Barbier, V., Nowlan, B., Helwani, F., Poulton, I.J., Van Rooijen, N., Alexander, K.A., Raggatt, L.J., et al. (2010). Bone marrow macrophages maintain hematopoietic stem cell (HSC) niches and their depletion mobilizes HSCs. *Blood* **116**, 4815–4828.
- Winkler, I.G., Barbier, V., Nowlan, B., Jacobsen, R.N., Forristal, C.E., Patton, J.T., Magnani, J.L., and Lévesque, J.-P. (2012). Vascular niche E-selectin regulates hematopoietic stem cell dormancy, self renewal and chemoresistance. *Nat. Med.* **18**, 1651–1657.
- Wray, J., Williamson, E.A., Singh, S.B., Wu, Y., Cogle, C.R., Weinstock, D.M., Zhang, Y., Lee, S.-H., Zhou, D., Shao, L., et al. (2013). PARP1 is required for chromosomal translocations. *Blood* **121**, 4359–4365.
- Wright, D.E., Wagers, A.J., Gulati, A.P., Johnson, F.L., and Weissman, I.L. (2001). Physiological migration of hematopoietic stem and progenitor cells. *Science* **294**, 1933–1936.
- Wright, D.E., Bowman, E.P., Wagers, A.J., Butcher, E.C., and Weissman, I.L. (2002). Hematopoietic stem cells are uniquely selective in their migratory response to chemokines. *J. Exp. Med.* **195**, 1145–1154.
- Wu, L., and Hickson, I.D. (2003). The Bloom’s syndrome helicase suppresses crossing over during homologous recombination. *Nature* **426**, 870–874.
- Wu, A.M., Siminovitch, L., Till, J.E., and McCulloch, E.A. (1968). Evidence for a relationship between mouse hemopoietic stem cells and cells forming colonies in culture. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **59**, 1209–1215.
- Wu, M.X., Ao, Z., Prasad, K.V., Wu, R., and Schlossman, S.F. (1998). IEX-1L, an apoptosis inhibitor involved in NF-kappaB-mediated cell survival. *Science* **281**, 998–1001.

Wu, M.X., Ustyugova, I.V., Han, L., and Akilov, O.E. (2013). Immediate early response gene X-1, a potential prognostic biomarker in cancers. *Expert Opin. Ther. Targets* 17, 593–606.

Wu, S., Cetinkaya, C., Munoz-Alonso, M.J., Von der Lehr, N., Bahram, F., Beuger, V., Eilers, M., Leon, J., and Larsson, L.-G. (2003). Myc represses differentiation-induced p21CIP1 expression via Miz-1-dependent interaction with the p21 core promoter. *Oncogene* 22, 351–360.

Wyman, C., and Kanaar, R. (2006). DNA double-strand break repair: all's well that ends well. *Annu. Rev. Genet.* 40, 363–383.

-X-

Xie, Y., Yin, T., Wiegraebe, W., He, X.C., Miller, D., Stark, D., Perko, K., Alexander, R., Schwartz, J., Grindley, J.C., et al. (2009). Detection of functional haematopoietic stem cell niche using real-time imaging. *Nature* 457, 97–101.

Xu, D., and Qu, C.-K. (2008). Protein tyrosine phosphatases in the JAK/STAT pathway. *Front. Biosci.* 13, 4925–4932.

-Y-

Yacoub, A., Park, J.S., Qiao, L., Dent, P., and Hagan, M.P. (2001). MAPK dependence of DNA damage repair: ionizing radiation and the induction of expression of the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 human prostate carcinoma cells in a MEK1/2 dependent fashion. *Int. J. Radiat. Biol.* 77, 1067–1078.

Yacoub, A., McKinstry, R., Hinman, D., Chung, T., Dent, P., and Hagan, M.P. (2003). Epidermal growth factor and ionizing radiation up-regulate the DNA repair genes XRCC1 and ERCC1 in DU145 and LNCaP prostate carcinoma through MAPK signaling. *Radiat. Res.* 159, 439–452.

Yamtich, J., and Sweasy, J.B. (2010). DNA polymerase family X: function, structure, and cellular roles. *Biochim. Biophys. Acta* 1804, 1136–1150.

Yaneva, M., Kowalewski, T., and Lieber, M.R. (1997). Interaction of DNA-dependent protein kinase with DNA and with Ku: biochemical and atomic-force microscopy studies. *EMBO J.* 16, 5098–5112.

Yoshihara, H., Arai, F., Hosokawa, K., Hagiwara, T., Takubo, K., Nakamura, Y., Gomei, Y., Iwasaki, H., Matsuoka, S., Miyamoto, K., et al. (2007a). Thrombopoietin/MPL signaling regulates hematopoietic stem cell quiescence and interaction with the osteoblastic niche. *Cell Stem Cell* 1, 685–697.

You, Z., and Bailis, J.M. (2010). DNA damage and decisions: CtIP coordinates DNA repair and cell cycle checkpoints. *Trends Cell Biol.* 20, 402–409.

Yu, X., and Baer, R. (2000). Nuclear localization and cell cycle-specific expression of CtIP, a protein that associates with the BRCA1 tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* 275, 18541–18549.

Yu, X., and Chen, J. (2004). DNA damage-induced cell cycle checkpoint control requires CtIP, a phosphorylation-dependent binding partner of BRCA1 C-terminal domains. *Mol. Cell. Biol.* 24, 9478–9486.

- Zauli, G., Bassini, A., Vitale, M., Gibellini, D., Celeghini, C., Caramelli, E., Pierpaoli, S., Guidotti, L., and Capitani, S. (1997). Thrombopoietin enhances the alpha IIb beta 3-dependent adhesion of megakaryocytic cells to fibrinogen or fibronectin through PI 3 kinase. *Blood* 89, 883–895.
- Zeigler, F.C., De Sauvage, F., Widmer, H.R., Keller, G.A., Donahue, C., Schreiber, R.D., Malloy, B., Hass, P., Eaton, D., and Matthews, W. (1994). In vitro megakaryocytopoietic and thrombopoietic activity of c-mpl ligand (TPO) on purified murine hematopoietic stem cells. *Blood* 84, 4045–4052.
- Zhang, J., Niu, C., Ye, L., Huang, H., He, X., Tong, W.-G., Ross, J., Haug, J., Johnson, T., Feng, J.Q., et al. (2003). Identification of the haematopoietic stem cell niche and control of the niche size. *Nature* 425, 836–841.
- Zhang, S., Yajima, H., Huynh, H., Zheng, J., Callen, E., Chen, H.-T., Wong, N., Bunting, S., Lin, Y.-F., Li, M., et al. (2011). Congenital bone marrow failure in DNA-PKcs mutant mice associated with deficiencies in DNA repair. *J. Cell Biol.* 193, 295–305.
- Zhang, Y., Sun, S., Wang, Z., Thompson, A., Kaluzhny, Y., Zimmet, J., and Ravid, K. (2002). Signaling by the Mpl receptor involves IKK and NF-kappaB. *J. Cell. Biochem.* 85, 523–535.
- Zhang, Y., Gostissa, M., Hildebrand, D.G., Becker, M.S., Boboila, C., Chiarle, R., Lewis, S., and Alt, F.W. (2010). The role of mechanistic factors in promoting chromosomal translocations found in lymphoid and other cancers. *Adv. Immunol.* 106, 93–133.
- Zhao, C., Xiu, Y., Ashton, J., Xing, L., Morita, Y., Jordan, C.T., and Boyce, B.F. (2012). Noncanonical NF- κ B signaling regulates hematopoietic stem cell self-renewal and microenvironment interactions. *Stem Cells* 30, 709–718.
- Zhong, R.K., Astle, C.M., and Harrison, D.E. (1996). Distinct developmental patterns of short-term and long-term functioning lymphoid and myeloid precursors defined by competitive limiting dilution analysis in vivo. *J. Immunol.* 157, 138–145.
- Zhou, B.B., and Elledge, S.J. (2000). The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 408, 433–439.
- Zhou, S., Schuetz, J.D., Bunting, K.D., Colapietro, A.M., Sampath, J., Morris, J.J., Lagutina, I., Grosveld, G.C., Osawa, M., Nakauchi, H., et al. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat. Med.* 7, 1028–1034.
- Ziegler, B.L., Valtieri, M., Porada, G.A., De Maria, R., Müller, R., Masella, B., Gabbianelli, M., Casella, I., Pelosi, E., Bock, T., et al. (1999). KDR receptor: a key marker defining hematopoietic stem cells. *Science* 285, 1553–1558.
- Zou, P., Yoshihara, H., Hosokawa, K., Tai, I., Shinmyozu, K., Tsukahara, F., Maru, Y., Nakayama, K., Nakayama, K.I., and Suda, T. (2011). p57(Kip2) and p27(Kip1) cooperate to maintain hematopoietic stem cell quiescence through interactions with Hsc70. *Cell Stem Cell* 9, 247–261.

Annexe1

ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response.

Pawlikowska P, Leray I, de Laval B, Guihard S, Kumar R, Rosselli F, Porteu F.

Cell Death Differ. 2010; 17(11):1739-50

ATM-dependent expression of IEX-1 controls nuclear accumulation of Mcl-1 and the DNA damage response

P Pawlikowska^{1,2,3}, I Leray^{1,2,3}, B de Laval^{1,2,3}, S Guihard^{1,2,3}, R Kumar⁴, F Rosselli⁵ and F Porteu^{*,1,2,3}

The early-response gene product IEX-1 (also known as IER3) was recently found to interact with the anti-apoptotic Bcl-2 family member, myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1). In this study we show that this interaction specifically and timely controls the accumulation of Mcl-1 in the nucleus in response to DNA damage. The IEX-1 protein is rapidly induced by γ -irradiation, genotoxic agents or replication inhibitors, in a way dependent on ataxia telangiectasia mutated (ATM) activity and is necessary for Mcl-1 nuclear translocation. Conversely, IEX-1 protein proteasomal degradation triggers the return of Mcl-1 to the cytosol. IEX-1 and Mcl-1 are integral components of the DNA damage response. Loss of IEX-1 or Mcl-1 leads to genomic instability and increased sensitivity to genotoxic and replicative stresses. The two proteins cooperate to maintain Chk1 activation and G2 checkpoint arrest. Mcl-1 nuclear translocation may foster checkpoint and improve the tumor resistance to DNA damage-based cancer therapies. Deciphering the pathways involved in IEX-1 degradation should lead to the discovery of new therapeutic targets to increase sensitivity of tumor cells to chemotherapy.

Cell Death and Differentiation (2010) 17, 1739–1750; doi:10.1038/cdd.2010.56; published online 14 May 2010

Cells respond to DNA damage by activating a protein network that recognizes the damaged DNA, triggering cell cycle checkpoints, repair of the damaged DNA and/or cell death. The DNA damage response (DDR) is regulated by two primary signaling pathways activated downstream of the effector kinases, ataxia-telangiectasia mutated (ATM) and ATM-and Rad3-related (ATR), which are mutated in ataxia-telangiectasia and Seckel syndrome, respectively. ATM is activated in response to agents inducing DNA double-strand breaks (DSBs), whereas ATR responds to a broad spectrum of genotoxic stresses. In the presence of DSBs, the Mre11/Rad50/Nbs1 complex accumulates at DNA-damage sites, forming subnuclear foci. Recruitment of ATM to this complex fosters its activation, leading to phosphorylation of numerous substrates, including the histone H2AX that serves as a scaffold for the recruitment of DNA repair and checkpoint signaling proteins. ATM triggers the processing of DSBs into extended regions of single-stranded DNA. ATR is then recruited and activated to RPA-coated ssDNA. ATM and ATR phosphorylate the checkpoint kinases Chk1 and Chk2, respectively, which will give cell the time to repair the damaged DNA by arresting their cycle at the G1-S or G2-M transitions and within the S phase.¹

In the face of irreparable damage the cell may activate its apoptotic machinery. On the contrary, in response to low levels of damage and during the checkpoint arrests, apoptosis needs to be suppressed to allow repair and avoid

unnecessary cell destruction. The correct balance between cell cycle arrest and apoptosis is crucial to ensure genomic stability. This suggests a high and complex interplay between proteins controlling the DDR and the apoptotic pathways. Evolutionary conserved Bcl-2 family members are central regulators of apoptosis. Myeloid cell leukemia-1 (Mcl-1) is an anti-apoptotic member of this family. Models of Mcl-1 knock-out mice have shown its requirement for embryonic development and differentiation of various hematopoietic lineages.^{2–4} Mcl-1 is regulated at transcriptional, post-transcriptional and post-translational levels.^{5,6} Its anti-apoptotic function is regulated by interaction with other Bcl-2 family members.⁷ Outside of this family, Mcl-1 interacts with proteins regulating apoptosis or cell proliferation, including fortilin, cdk1 and PCNA.^{8–10} Recent studies have identified immediate early-response gene X-1 (IEX-1, also known as IER3) as a new partner of Mcl-1.^{11,12} IEX-1 is an early-response gene product that is rapidly induced by growth factors, ionizing radiations and viral infections. Conflicting data have been reported concerning its role in survival: IEX-1 was found to not only increase apoptosis in response to TNF- α ,^{11,13–15} but also to contribute to growth factor-mediated survival^{15,16} and to prevent activation-induced T-cell death.^{17,18} Other functions have been attributed to IEX-1 such as regulation of ERK, Akt and NF- κ B signaling pathways.^{14,16,19}

Unlike a previous report,¹² we found that although IEX-1 and Mcl-1 inhibit staurosporin-induced apoptosis, this function

¹INSERM U1016, Institut Cochin, Paris, France; ²CNRS UMR 8104, Paris, France; ³Université Paris Descartes, Paris, France; ⁴Mayo Clinic, Rochester, MN, USA and ⁵CNRS FRE2939, Université Paris Sud, Institut Gustave Roussy, Villejuif, France

*Corresponding author: F Porteu, Institut Cochin, INSERM U1016, CNRS UMR8104, 27 rue du fg st Jacques, Paris 75014, France. Tel: +33 14 051 6515; Fax: +33 14 051 6510; E-mail: francoise.porteu@inserm.fr

Keywords: IEX-1; Mcl-1; DNA damage; checkpoint; apoptosis

Abbreviations: IEX-1, immediate early-response gene X-1; Mcl-1, myeloid cell leukemia-1; ATM, ataxia-telangiectasia mutated; ATR, ATM-and Rad3-related; DDR, DNA damage response; DSB, double strand break; IR, ionizing radiation; HU, hydroxyurea; LLnL, *N*-acetyl-Leu-Leu-NorLeu-al; PI, propidium iodide; IF, immunofluorescence; N/C, nuclear/cytoplasmic; MEF, mouse embryonic fibroblast; WT, wild type; Lin[−], lineage-negative bone marrow cell; TM, transmembrane region; NLS, nuclear localization signal; shRNA, short hairpin RNA; CHO, Chinese hamster ovary; FCS, fetal calf serum; NEAA, non-essential amino acid; PS, penicillin/streptomycin; RT, room temperature

Received 17.12.09; revised 16.3.10; accepted 18.3.10; Edited by A Villunger; published online 14.5.10

is independent of their interaction. A recent study reported that Mcl-1 translocates to the nucleus after treatment with etoposide.²⁰ In this study we show that Mcl-1 nuclear translocation is a general response to genotoxic stress and that it is strictly and timely controlled by IEX-1. IEX-1 expression is rapidly induced by DNA-damaging agents in an ATM-dependent manner and is necessary for Mcl-1 nuclear translocation. Conversely, IEX-1 protein degradation triggers Mcl-1 return to the cytosol. IEX-1 and Mcl-1 are integral components of the DDR pathway. They cooperate to maintain Chk1 activation, and regulate proper G2 checkpoint arrest and repair of DNA lesions and cell survival after treatments with various DNA-damaging agents.

Results

Mcl-1 nuclear accumulation is induced by genotoxic stress and is controlled by IEX-1. Anti-HA antibodies could immunoprecipitate Mcl-1 but not Bcl-2 from cells transfected with HA-IEX-1 and either Myc-Mcl-1 or Flag-Bcl-2 (Figure 1a and Supplementary Figure S1-a). Immunofluorescence (IF) analysis revealed that expression of GFP-IEX-1 induced a striking accumulation of endogenous Mcl-1, but not of Bcl-2 or Bcl-xL, to the nucleus (Figure 1b and Supplementary Figure S1-b). Measurement of mean pixel intensities in the nucleus and in the cytoplasm of random cells showed that Mcl-1, but not Bcl-2 or Bcl-xL, was enriched in the nucleus of the cells overexpressing GFP-IEX-1 (Supplementary Figure S1-c). IEX-1 possesses a nuclear localization signal (NLS) and a putative transmembrane (TM) region.^{15,21,22} Deletion of IEX-1 NLS prevented Mcl-1 nuclear accumulation but not Mcl-1/IEX-1 interaction (Supplementary Figure S1a and b) whereas deletion of IEX-1 TM (IEX-1-ΔTM) abolished both events (Figures 1a and b). Thus, IEX-1-induced Mcl-1 nuclear accumulation is dependent on its interaction with Mcl-1 and requires an intact NLS.

Endogenous IEX-1 expression and Mcl-1 nuclear accumulation were conjointly induced by a variety of DNA-damaging agents such as etoposide, ionizing radiations (IRs) and the replicative inhibitor hydroxyurea (HU) (Figure 1c). IEX-1 could be detected by IF as soon as 30 min after IR (data not shown). The Mcl-1 nuclear/cytoplasmic (N/C) IF intensity ratio was increased in the nucleus of all cells after IR (0.87 ± 0.016 and 1.8 ± 0.06 for non-treated and IR-treated cells, respectively, Supplementary Figure S1-c). Confirming these results, cell fractionation indicated that the nucleus of resting cells contains 15% (N/C ratio of 0.18) of total Mcl-1, whereas this level reached up to 40% (N/C ratio of 0.8) after IR or HU (Figure 1d). Neither IEX-1 overexpression nor DNA damage had any effect on total Mcl-1 levels or half-life (Figure 1d and Supplementary Figure S1-d).

Endogenous IEX-1 and Mcl-1 colocalized in the nucleus and could be co-immunoprecipitated from the nuclear fraction of HeLa cells after HU or IR treatments (Figures 1c and e). IF analysis in cells subjected to detergent extraction before fixation showed that although the global intensity of the signal was greatly decreased under these conditions, most of the IR-treated cells stained positively for nuclear Mcl-1 and IEX-1 (Figure 1f). In contrast, the Mcl-1 signal was entirely

lost in non-treated cells. This further supports Mcl-1 delocalization upon IR and indicates that IEX-1 and Mcl-1 associate, at least partially, with the chromatin fraction after DNA damage.

HeLa cells expressing IEX-1 short hairpin RNAs (shRNAs)²³ showed a great decrease in both IEX-1 induction and Mcl-1 nuclear accumulation upon HU or IR treatment (Figures 2a and b). Fractionation experiments showed that IR increased Mcl-1 levels in the nuclear fraction of cells expressing scramble but not IEX-1 shRNAs (Figure 2c). Moreover, although in IEX-1^{+/+} hematopoietic progenitors Mcl-1 had entirely moved from the cytoplasm to the nucleus 3 h after IR, its localization remained unchanged in IEX-1^{-/-} cells (Figure 2d). Expression of IEX-1 in IEX-1^{-/-} mouse embryonic fibroblasts (MEFs) restored IR-mediated Mcl-1 nuclear staining (Supplementary Figure S2). Thus, IEX-1 induction is a prerequisite for IR-induced Mcl-1 nuclear translocation.

ATM activity is required for IEX-1 expression and to maintain Mcl-1 in the nucleus. Both IR- or HU-mediated IEX-1 expression and Mcl-1 nuclear accumulation were abolished in ATM-deficient GM3189 lymphoblastoid cells and upon treatment of HeLa cells with the ATM inhibitors caffeine and KU-55933 (Figures 3a and b), showing that these events require ATM activity.

IEX-1 is a short half-life protein, sensitive to degradation by the proteasome. In cells treated overnight with HU and then released in HU-free medium, IEX-1 staining was strong at 5 h, started to fade at 9 h and disappeared at 16 h (Figure 3c). Mcl-1 localized to the nucleus as long as IEX-1 was present and returned to the cytosol when IEX-1 vanished. Addition of the proteasome inhibitor, *N*-acetyl-Leu-Leu-NorLeu-al (LLnL), at 5 h prevented IEX-1 disappearance and Mcl-1 nuclear exit. In the absence of HU, treatment with LLnL alone for 4 h did not induce IEX-1. In agreement with previous reports,^{5,6} Mcl-1 expression increased slightly under these conditions but it remained mostly located in the cytoplasm. No apoptosis could be detected up to 16 h, showing that neither the nuclear localization of Mcl-1 nor its relocalization to the cytosol is linked to cell death. Thus, IEX-1 is necessary to both bring and maintain Mcl-1 into the nucleus.

To determine whether ATM activity is required to maintain IEX-1 expression once induced, the cells were synchronized, arrested in G2 by IR and then treated with caffeine or KU-55933.²⁴ Inhibition of ATM activity accelerated IEX-1 degradation and triggered Mcl-1 nuclear exit (Figure 3d), showing that IEX-1 induction and degradation, as well as the subsequent nucleo-cytoplasmic movement of Mcl-1, are DNA damage- and ATM-controlled events.

Mcl-1-deficient cells show prolonged DNA damage and impaired DNA repair. To assess the role of Mcl-1 in the DDR, we first monitored the extent of DNA damage by analyzing the presence of γ -H2AX foci. At 30 min after HU treatment, most Mcl-1^{+/+} and Mcl-1^{-/-} MEFs presented γ -H2AX foci. However, γ -H2AX staining declined more rapidly in wild-type (WT) than in Mcl-1^{-/-} cells (Figure 4a and Supplementary Figure S3-a). Mcl-1^{-/-} MEFs regained normal γ -H2AX foci disappearance kinetics upon infection with a Mcl-1-encoding but not with an empty vector. The slower removal of γ -H2AX foci, indicative of prolonged DNA

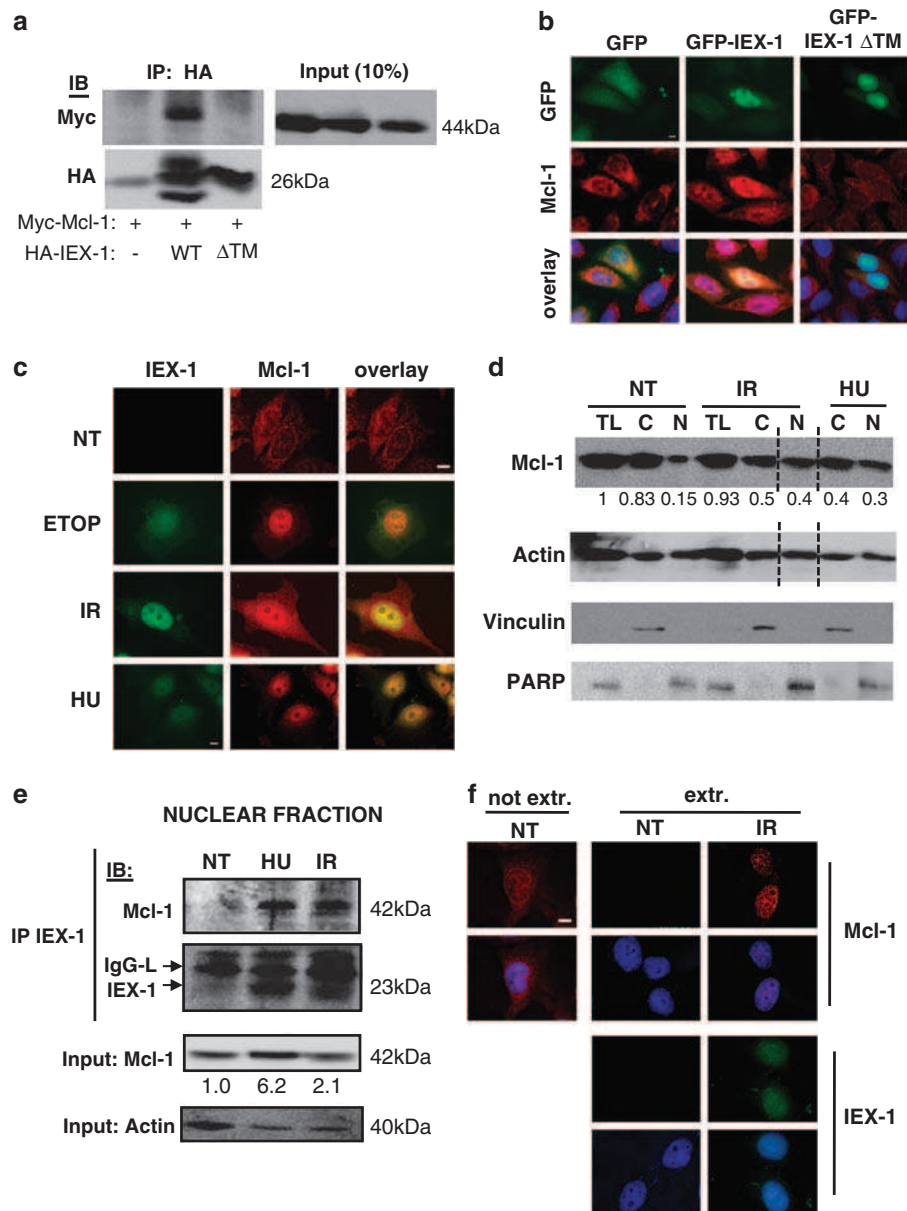


Figure 1 IEX-1 protein expression and Mcl-1 nuclear accumulation are conjointly induced by DNA damage. (a) CHO cells were transfected with Myc-Mcl-1 with or without HA-IEX-1 WT or ΔTM. Anti-HA immunoprecipitates (IP) and total lysates (input) were immunoblotted (IB) with the indicated antibodies. (b) HeLa cells transfected with GFP, GFP-IEX-1 WT or ΔTM were stained with anti-Mcl-1 (red) and counterstained with DAPI (blue). (c) HeLa cells were untreated (NT) or treated with etoposide (100 μM, 4 h), IR (10 Gy, 6 h) or HU (2.5 mM, 4 h), fixed and stained with anti-IEX-1 (green) and anti-Mcl-1 (red). (d, e) HeLa cells were treated as in (c). One part of the cells was used for total lysates (TL) and the other part was fractionated. TL, cytosolic (C) and nuclear (N) extracts were directly loaded on SDS gels (d) or IP with anti-IEX-1 antibodies (e). Input: 10% of nuclear extracts. Mcl-1 quantifications, normalized to actin levels, are expressed relative to the levels in NT cells. The results shown in d come from a unique blot that was cutoff (dotted line). (f) HeLa cells were not treated (NT) or irradiated (10 Gy). After 6 h, the soluble proteins were extracted (extr.) or not (not extr.) before fixation and staining with anti-Mcl-1 (red) or anti-IEX-1 (green). Nuclei were counterstained with DAPI. Bars, 10 μm

damage, was also found after irradiation of shMcl-1-expressing HeLa cells (Supplementary Figure S3-b).

Persistent DNA damage may result from defects in DNA repair, cell cycle checkpoints or both. To analyze the first possibility, we performed comet assays. DNA breaks are visible by increased DNA mobility or 'comet tails'. The comet tail moment was measured to quantify the extent of unrepaired DNA. Just after irradiation, all the cells showed

comparable amounts of DNA breaks. However, 1 h later, Mcl-1^{+/+} MEFs had rejoined 74% of the breaks, whereas 63% of them remained unrepaired in Mcl-1^{-/-} cells. This defect was completely restored upon re-expression of Mcl-1 in Mcl-1^{-/-} cells (Figure 4b). Interestingly, non-treated-Mcl-1^{-/-} cells had a basal tail moment slightly but reproducibly higher than control cells, showing that they contain unresolved DNA damage. This suggests that Mcl-1 could have a role in the

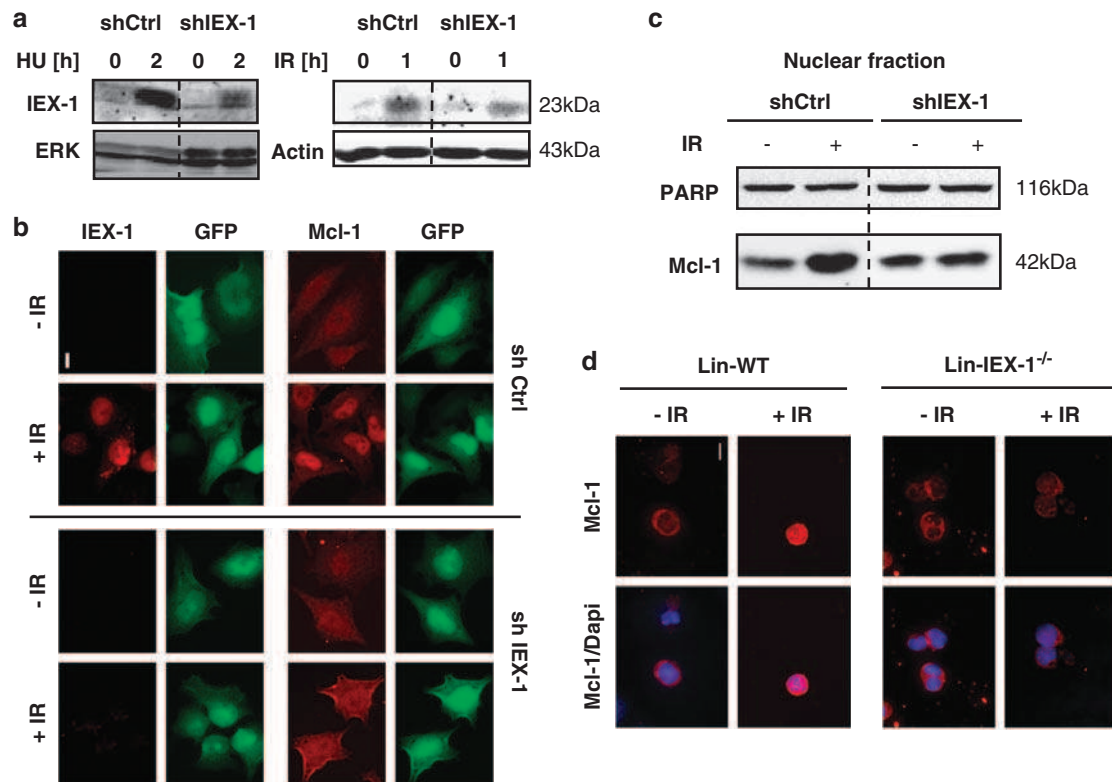


Figure 2 DNA damage-induced Mcl-1 nuclear localization depends on IEX-1 expression. (**a–c**) HeLa cells were infected with lentiviruses encoding scramble or IEX-1 shRNAs and GFP and treated with HU or IR (10 Gy). (**a**) Total lysates were assessed for IEX-1 expression by IB. (**b**) The cells were fixed and stained either with anti-IEX-1 (red) or Mcl-1 antibodies (red). GFP (green) indicates infected cells. (**c**) Nuclear extracts were prepared, treated with formaldehyde and analyzed by IB. (**d**) IEX-1^{-/-} or WT Lin⁻ progenitors were irradiated with 10 Gy, fixed 3 h later, and stained with anti Mcl-1 antibody and DAPI. Bars, 10 μ m

repair of both induced and spontaneous DNA damage occurring during normal DNA replication.

Mcl-1 deficiency leads to impaired Chk1 phosphorylation and G2/M arrest. To get insights into the mechanisms by which Mcl-1 influences the DDR, we examined whether its expression affected DNA damage signaling. ATM phosphorylation was not decreased but was rather more pronounced in shMcl-1-expressing HeLa cells (Figure 5a). The loss of Mcl-1 led to a decreased IR-induced Chk1 phosphorylation on serines 296, 345 and 317, the three sites targeted by ATR (Figures 5a and b). This effect was particularly striking at longer time points, suggesting that Mcl-1 is not required to activate Chk1 but to maintain its activity. No decrease in the phosphorylation of the other ATM/ATR substrates, Chk2, RPA32, Rad17, SMC1 and NBS1, could be observed. The prolonged phosphorylation of H2AX confirmed the sustained presence of γ -H2AX foci in Mcl-1-deficient cells. These data suggest that Mcl-1 contributes to DDR by maintaining selectively Chk1 activation.

Chk1 is required for intra-S and G2/M checkpoint activation. To analyze both phases of the cell cycle, the cells were doubly labeled with BrdU and propidium iodide (PI). Inhibition of Mcl-1 expression had no effect on the unperturbed cell cycle (Figure 5c). IR induced accumulation of control cells in the S and G2 phases of the cell cycle. Mcl-1 downregulation had no effect on the S-phase progression or on the accumulation

in G2 until 6 h after IR. However, at 24 h after IR, although control cells were still blocked in G2, shMcl-1-expressing cells had already started to re-enter in G1. A similar shorter G2 arrest was observed in Mcl-1-deficient MEFs (Supplementary Figure S3-c). Thus, Mcl-1 is indispensable to maintain Chk1 phosphorylation and the G2 checkpoint, allowing correct DNA repair in response to DNA damage.

IEX-1- and Mcl-1 act on the same pathway to regulate the DDR. HeLa cells expressing IEX-1-shRNA, as well as IEX-1^{-/-} MEFs, showed spontaneous DNA breakage and, after IR, sustained γ -H2AX staining, delayed repair of DSBs (Figure 6a and Supplementary Figure S4-a), reduced length of the G2/M arrest (Figure 6b) and decreased Chk1 phosphorylation (Figure 6c and Supplementary Figure S4-b). Infection of IEX-1^{-/-} MEFs with IEX-1-encoding vector rescued completely the kinetics of γ -H2AX foci removal and of DNA repair in response to IR (Figure 6a and Supplementary Figure S4-a). Thus, IEX-1 deficiency recapitulates Mcl-1 deficiency, suggesting that the two proteins act on the same pathway in the DDR. In agreement with this hypothesis, IEX-1^{-/-} cells expressing the IEX-1- Δ TM mutant, which fails to interact with Mcl-1, behaved as IEX-1^{-/-} cells transfected with GFP (Figure 6a and Supplementary Figure S4-a). Moreover, expression of IEX-1 could rescue the kinetics of disappearance of γ -H2AX foci in HeLa cells expressing shIEX-1 but not in cells expressing

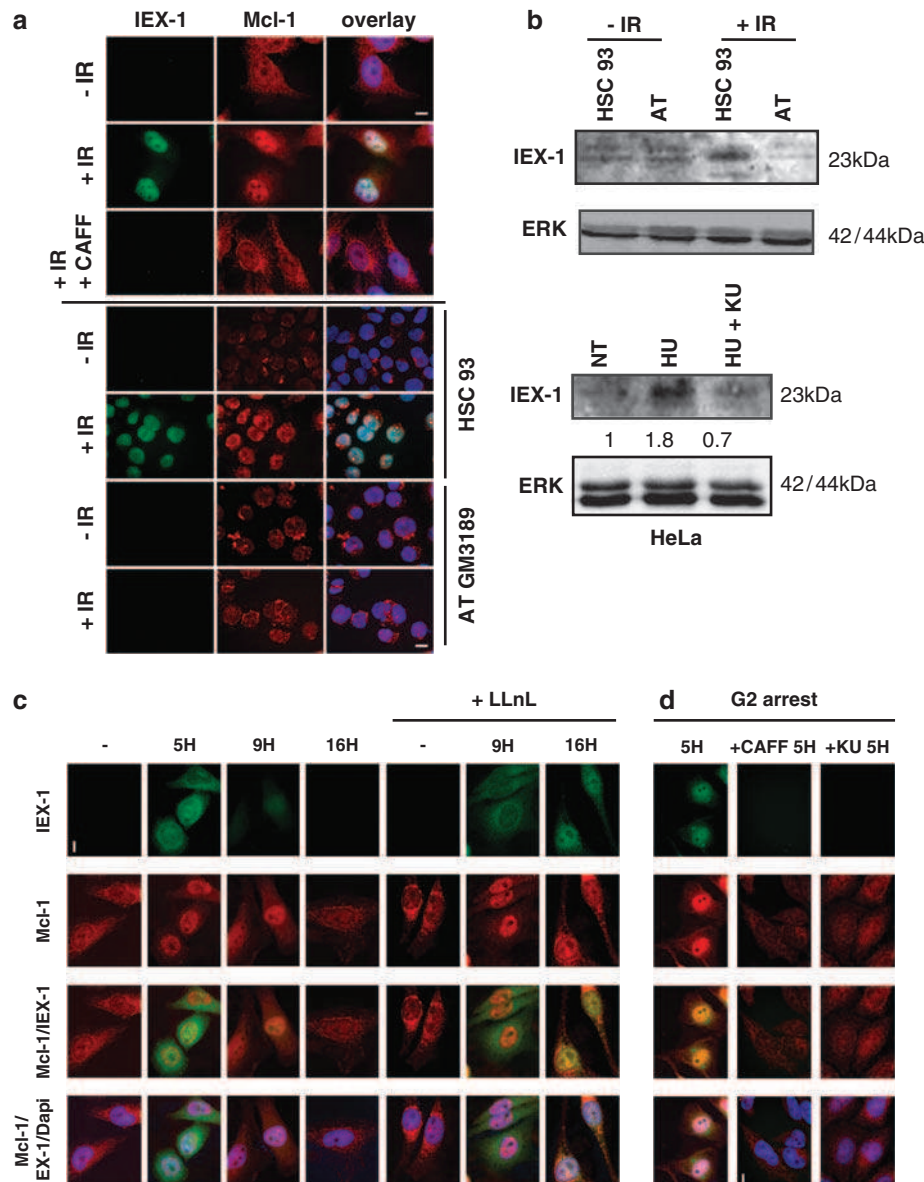


Figure 3 IEX-1 expression and degradation are controlled by ATM activity. (a, b) HeLa cells or the lymphoblastic cell lines HSC93 (WT) and AT GM3189 were IR or treated with HU. After 2–4 h, the cells were either stained for IEX-1 (green) and Mcl-1 (red) (a) or lysed and analyzed by IB (b). Where indicated, 3 mM caffeine was added 30 min before treatment. Quantification of IEX-1 levels is shown relative to the level of IEX-1 in non-treated cells, after normalization to ERK levels. (c) HeLa cells were treated overnight with HU (1.5 mM) and released in fresh medium. LLnL (25 μ M) or vehicle alone was added 5 h later and the incubation was pursued for 4 or 11 h (9 and 16 h total time). Exponentially growing cells treated or not for 4 h with LLnL were used as controls. At the indicated times, the cells were fixed and stained for IEX-1 (green) and Mcl-1 (red). Nuclei were counterstained with DAPI. (d) HeLa cells were synchronized in G1/S by double thymidine block, released in medium for 6 h and IR (10 Gy). At 16 h after IR, caffeine (3 mM) or KU-55933 (10 μ M) was added or not and IEX-1 and Mcl-1 expression were analyzed by IF 5 h later. Bars, 10 μ m

shIEX-1 and shMcl-1 together (Figure 6d). This shows that the ability of IEX-1 to affect the DDR requires association with Mcl-1 and its translocation to the nucleus.

We then determined the region of Mcl-1 involved in IEX-1 binding. Truncation of the C-terminal 20 amino-acids of Mcl-1 (Δ Cter), encoding the transmembrane region, abolished its interaction with IEX-1 (Figure 7a). Mcl-1 WT, but not Δ Cter, could fully restore DNA repair as well as Chk1 phosphorylation in Mcl-1^{-/-} MEFs (Figures 7b and c). However, Mcl-1 WT was unable to restore the rapid disappearance of γ -H2AX foci of Mcl-1^{-/-} MEFs in which IEX-1 expression had been

knocked down by IEX-1 shRNAs (Figure 7d). Altogether, these results show that IEX-1 and Mcl-1 require each other and act on a unique pathway to regulate the DDR.

IEX-1- or Mcl-1-deficient cells show genomic instability. Mcl-1^{-/-} MEFs and IEX-1^{-/-} progenitors showed increased sensitivity to IR, relative to their WT counterparts (Figures 8a and b). After IR or HU, up to 62% of shIEX-1- and shMcl-1-expressing cells presented micro or fragmented nuclei, which could be easily distinguished from apoptotic cells (Figure 8c). Spontaneous micronuclei were also observed

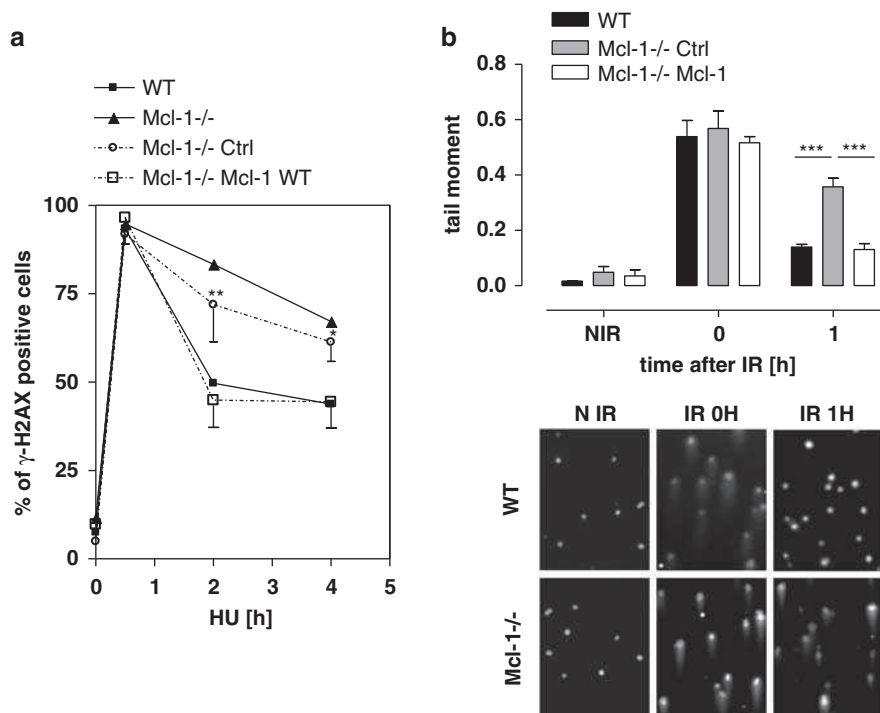


Figure 4 Mcl-1 deficient cells show increased DNA damage. (a) WT and Mcl-1^{-/-} MEFs infected with empty (Ctrl) or Myc-Mcl-1-expressing retroviruses were treated with HU (2 mM) for various times, and fixed and stained with anti- γ -H2AX antibody. Cells containing ≥ 10 foci were scored as positive. At least 250 cells were counted for each time point. Means and S.E.M. from three independent experiments are shown. (b) WT and Mcl-1^{-/-} MEFs infected as above were irradiated (10 Gy) and transferred to agarose for comet assay, directly (0) or after 1 h of recovery. Tail moments were scored from at least 80 cells per point. Means \pm S.E.M from three independent experiments and representative pictures are shown. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

at a frequency slightly higher (1.4- to 2-fold) in these cells than in shControl-expressing cells. Other abnormalities, indicative of increased genomic instability, such as nuclear blebbing, multinucleation or unequal division, were also observed in the absence of IEX-1 or Mcl-1.

IEX-1-deficient mice also showed genomic instability. At 1 month after whole-body irradiation, metaphase spreads of cells isolated from IEX-1^{-/-} bone marrows and spleens showed a significant increase in chromosomal aberrations when compared with controls (Figure 8d). Thus, the absence of IEX-1 leads to sustained DNA lesions in hematopoietic cells. However, no difference in survival between WT and IEX-1^{-/-} mice was observed at that time, suggesting that compensatory mechanisms would limit the effect of this defect on irradiated organisms.

Discussion

Cell cycle arrest, survival and DNA repair are coordinately controlled in the face of DNA damage. Recent data have revealed the existence of unexpected direct interactions between checkpoint/repair components and members of the Bcl-2 family or other regulators of the apoptotic pathway. For example, Bid and APAF translocate to the nucleus and affect S-phase arrest after DNA damage,²⁵⁻²⁷ and Bax and Bcl-2 negatively regulate homologous recombination.²⁸ In this study we show that Mcl-1 is an integral component of the DDR, in multiple types of primary and transformed cells, and in response to various stresses such as IR, genotoxic

agents or replication inhibitors. Cells lacking Mcl-1 show altered G2 checkpoint, leading to extended DNA damage and inefficient DNA repair. These defects translate into increased genomic instability and sensitivity in response to DNA damage.

DNA damage triggers a striking accumulation of Mcl-1 in the nucleus and its association with the chromatin. The signal regulating Bid function in DNA damage is provided by ATM phosphorylation.^{25,27} The Mcl-1 protein sequence does not present ATM/ATR phosphorylation sites. We show that Mcl-1 nuclear accumulation and function upon DNA damage occurs in an ATM-dependent manner through a new mechanism involving its association with IEX-1. Indeed, (1) IEX-1 binds to Mcl-1 and triggers its nuclear accumulation; (2) Mcl-1 nuclear accumulation and induction of IEX-1 by DNA-damaging agents are concomitant and dependent on ATM activity; (3) DNA damage-induced Mcl-1 nuclear accumulation is blunted in IEX-1-deficient cells; and (4) IEX-1 and Mcl-1 are functionally interdependent, as IEX-1 or Mcl-1 expression cannot restore the DDR in a double IEX-1- and Mcl-1-deficient background. IEX-1 loss can fully reproduce the defects in G2 arrest and DNA repair of Mcl-1-deficient cells. Bone marrows and spleens of IEX-1^{-/-} mice also presented signs of genomic instability 1 month after whole-body irradiation, showing that impeding Mcl-1 nuclear accumulation is biologically significant. IEX-1 serves as a signal for Mcl-1 nuclear entry and as an anchor to maintain it in the nucleus during the DDR. Indeed, Mcl-1 relocalization to the cytoplasm is concomitant to IEX-1 disappearance and is prevented upon

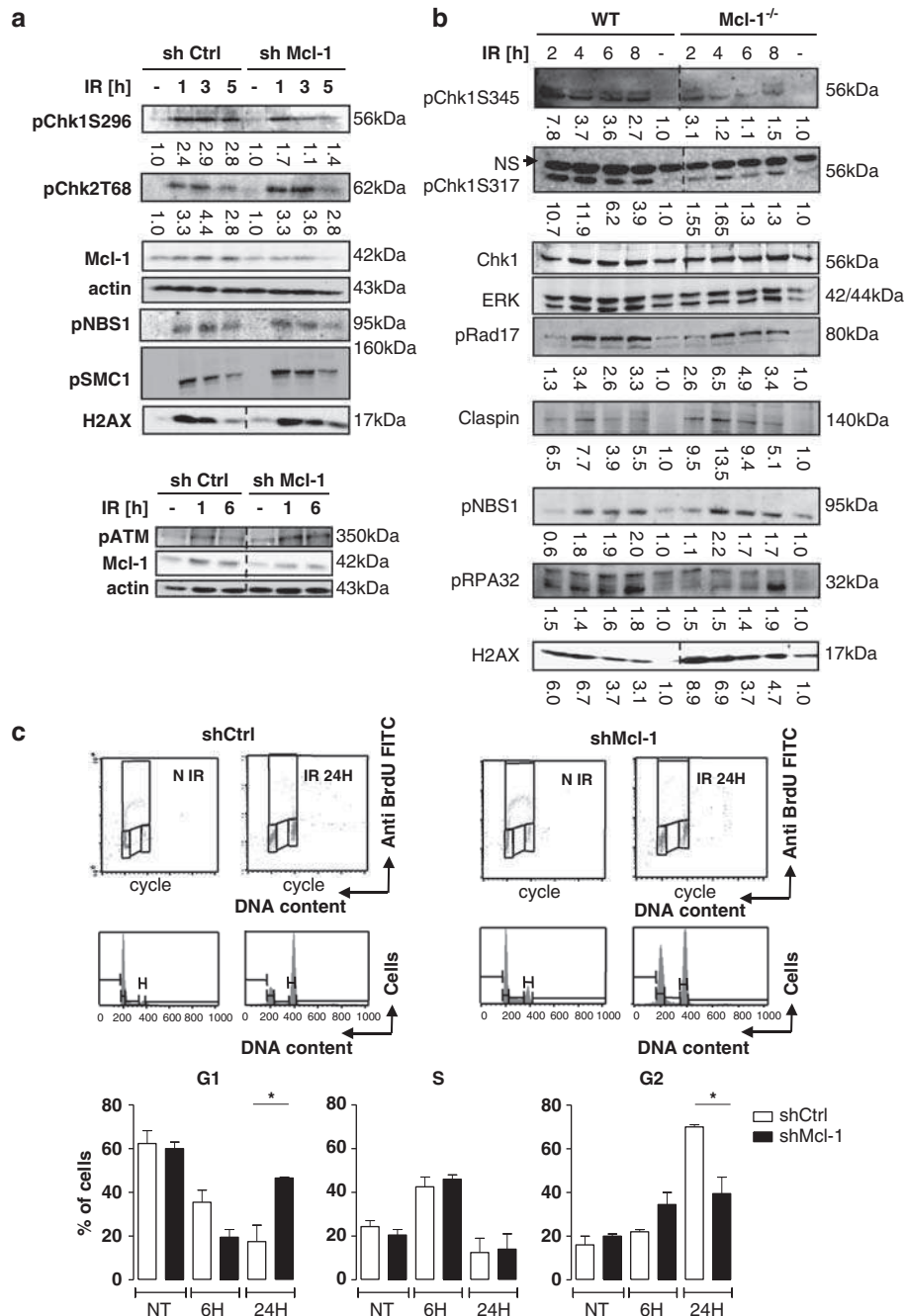


Figure 5 Mcl-1 deficient cells show impaired Chk1 activity and G2/M checkpoint. HeLa cells expressing control or Mcl-1 shRNAs (**a, c**) or Mcl-1^{-/-} and Mcl-1^{+/+} MEFs (**b**) were harvested at various times after IR (10 Gy). (**a, b**) Total lysates were analyzed by IB with the indicated antibodies. To avoid repeated stripping, the same samples were loaded several times on 6–15% acrylamide gels. All the results shown come from unique blots and exposures. Images were cutoff (dotted line) when the samples were not loaded side by side. Quantifications are expressed relative to the levels before IR, after normalization on actin (**a**) or ERK (**b**) levels. (**c**) The cells were incubated for 30 min with BrdU and fixed. After staining with antibodies to BrdU and with PI, the cells were analyzed using flow cytometry. Representative dot plots and mean ± S.E.M. from three independent experiments are shown. **P* < 0.05

inhibition of IEX-1 degradation. Interestingly, IEX-1 degradation and Mcl-1 nuclear exit precede cell recovery from G2 arrest and re-entry into mitosis (Supplementary Figure S5-a). Silencing of checkpoint signaling, by adding ATM inhibitors after the cells were arrested in G2, accelerates IEX-1

degradation and Mcl-1 nuclear exit (Figure 3d), together with re-entry into mitosis (Supplementary Figure S5-b). Thus, both IEX-1 induction and degradation are DNA damage-sensed and ATM-dependent events. They represent a sensitive means to timely and specifically control the presence of

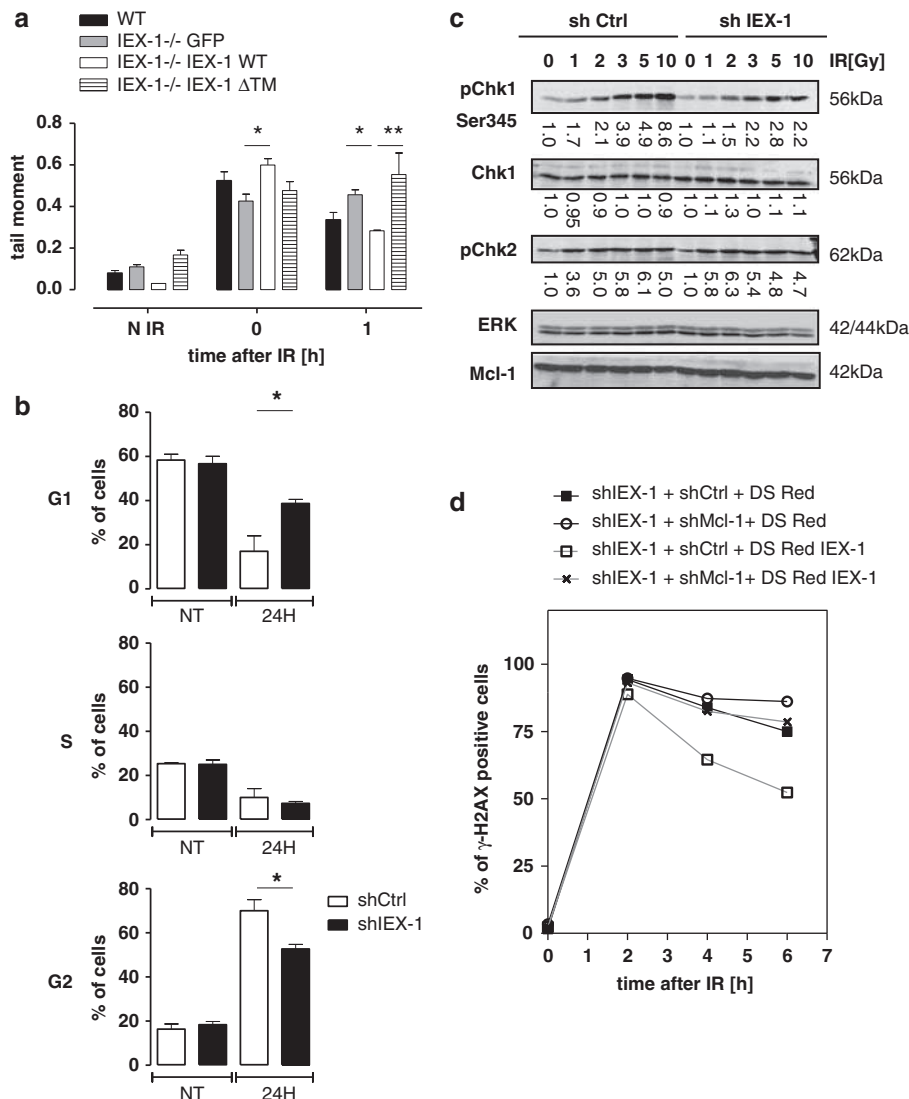


Figure 6 IEX-1 regulates DDR and this response requires interaction with Mcl-1. (a) WT MEFs, or IEX-1^{-/-} MEFs infected with GFP- or with IEX-1 WT- or ΔTM-encoding vectors, were subjected to IR (10 Gy). Comet tail moments were scored as in Figure 4b. Results are means and S.E.M. from three independent experiments. (b) HeLa cells expressing shIEX-1 or control were irradiated and analyzed for cell cycle 24 h later as described in Figure 5c. Means and S.E.M. of three independent experiments are shown. (c) IB analysis of total lysates prepared from shRNA-expressing HeLa cells harvested 2 h after IR with the indicated doses. Quantifications are expressed relative to the levels at the zero time point, after normalization on ERK levels. (d) HeLa cells expressing shIEX-1 together with either shRNA control or shMcl-1 were infected with mIEX-1 or empty retroviruses. At 6 h after IR (10 Gy), the cells were fixed and stained with anti-γH2AX. Results are means from duplicate slides in which at least 250 cells were counted. **P* < 0.05; ***P* < 0.01

Mcl-1 in the nucleus after DNA damage, allowing maintenance of the G2 arrest and its subsequent switch-off, authorizing the re-entry into the cell cycle.

Previous reports have shown that DNA damage can trigger a rapid decrease in Mcl-1 protein and/or mRNA levels, whereas others have reported the opposite results.^{5,20,29} These discrepancies may be linked to the types of detergent used to prepare the lysates, as we show that Mcl-1 partially associates with chromatin after DNA damage and/or with the doses of DNA-damaging agents. We did not observe major change in Mcl-1 levels, upon DNA damage, overexpression or downregulation of IEX-1, indicating that IEX-1 alters only Mcl-1 subcellular localization. IEX-1, as Mcl-1, associates with mitochondria and endoplasmic reticulum

membranes.^{15,16} IEX-1/Mcl-1 interaction requires their trans-membrane domains. Thus, IEX-1 could bind to Mcl-1 in the mitochondrial membrane and then transport it to the nucleus. Supporting this possibility, IEX-1-ΔNLS was unable to induce Mcl-1 nuclear accumulation and the two proteins co-precipitated from both nuclear and cytosolic fractions. On the other hand, Mcl-1 is present at low levels in the nucleus in the absence of genotoxic stress.^{8–10} Thus, although IEX-1 appears as a major mechanism controlling Mcl-1 nuclear accumulation upon DNA damage, Mcl-1 may transit to the nucleus independently of IEX-1 during the normal cell cycle. This result fits with previous reports showing that overexpression of Mcl-1 inhibits cell cycle progression in the absence of DNA damage.^{9,10}

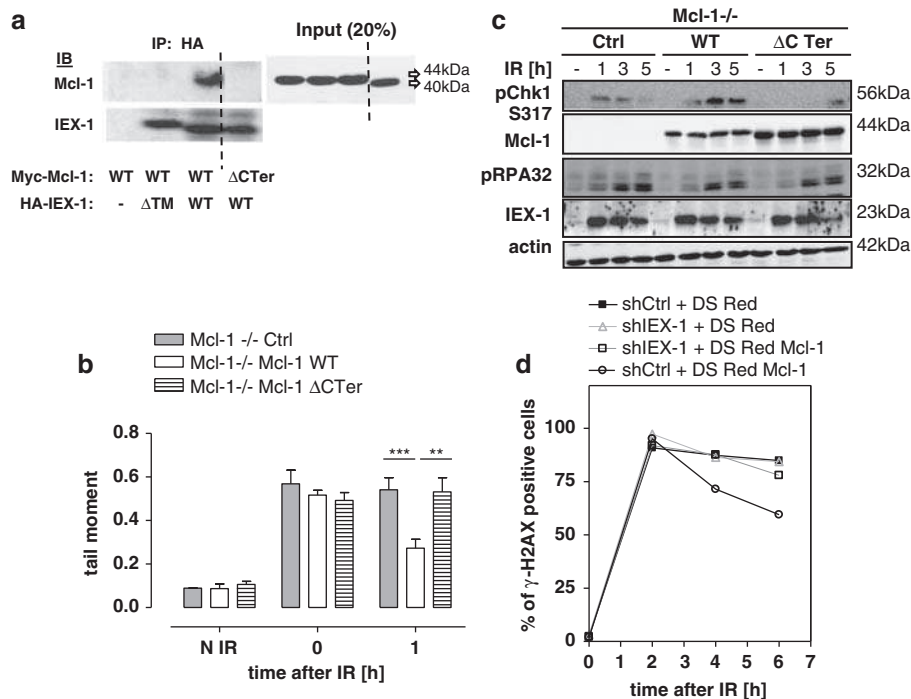


Figure 7 The ability of Mcl-1 to regulate DDR is dependent on IEX-1. (a) CHO cells were transiently transfected with HA-IEX-1 WT or ΔTM alone or with Myc-Mcl-1 WT or ΔCter mutant. Anti-HA immunoprecipitates were analyzed by IB. (b, c) Mcl-1^{-/-} MEFs infected with empty or myc-Mcl-1 WT or ΔCter-encoding viruses were irradiated (10 Gy) and harvested at different times for comet assays (b) or IB (c). (b) Means ± S.E.M. of three independent experiments. (d) Mcl-1^{-/-} MEFs expressing control or mIEX-1 shRNAs were subsequently infected with empty or WT Mcl-1-encoding vectors. At various times after IR, γH2AX foci were assessed. Results are means from duplicate slides in which at least 250 cells were counted. ***P* < 0.01; ****P* < 0.001

The slow decrease in the comet tail moments in IEX-1- or in Mcl-1-depleted cells after irradiation suggests that these cells accumulate DSBs because of defects in DNA repair. However, their cell cycle arrest was not longer. In fact the opposite is observed. This suggests that IEX-1/Mcl-1 complexes have a major role in checkpoint signaling, at the level or downstream of the activation of the checkpoint kinases. Indeed, Chk1 activation was selectively impaired in the absence of IEX-1 or Mcl-1. This defect can explain why these cells accumulate DSBs;³⁰ however, how IEX-1 and Mcl-1 cooperate to maintain Chk1 activation is unknown. After IR, several proteins required for the DDR accumulate to chromatin in discrete foci, which are needed for activation of Chk1/Chk2.¹ Although Mcl-1 and IEX-1 partially associate with chromatin, they do not seem to participate to the recruitment of DDR proteins to foci. Indeed, soon after IR, γ-H2AX was normally enriched in foci in Mcl-1 or IEX-1-deficient cells. This is consistent with the fact that IEX-1 expression and Mcl-1 nuclear accumulation could be detected only approximately 30 min after IR. Neither the phosphorylation of ATM and its substrates (NBS1, SMC1 and Chk2) nor that of the ATR substrates (RPA and Rad17) required for Chk1 activation³⁰ was compromised in the absence of Mcl-1, suggesting that IEX-1/Mcl-1 complexes affect signaling downstream of ATM/ATR activation. Jamil *et al.*²⁰ have reported that etoposide induces a truncated form of Mcl-1 that associates with Chk1, but we were unable to reproduce these results. This might be because of the different antibodies or lysates conditions used. Claspin binds to Chk1

and ATR and is essential for Chk1 phosphorylation.³¹ However, we could not precipitate Mcl-1 or IEX-1 with claspin. Claspin and Chk1 levels were not decreased in Mcl-1-deficient cells, showing that their degradation was not affected.^{32–34} On the other hand, IEX-1 mutants, which were impaired in their ability to inhibit PP2A,²³ could restore the DDR of IEX-1^{-/-} MEFs (data not shown), suggesting that IEX-1/Mcl-1 do not maintain Chk1 activity by inhibiting its dephosphorylation by these phosphatases.³⁵

In contrast with the apoptosis ensuing Mcl-1 mitochondrial degradation,⁵ the delocalization of Mcl-1 to the nucleus upon DNA damage triggers DNA repair and checkpoint survival signals. IEX-1 depletion increases cell radiosensitivity while leaving intact the Mcl-1- mitochondrial pool. Thus, Mcl-1 function in the DDR requires its nuclear localization and is separately controlled from its activity at the mitochondria. Mcl-1 is overexpressed in many tumors and it is often responsible for the resistance to treatment with the BH3-mimetic ABT-737.³⁶ Cancer therapies involving DNA-damaging agents have the potential to induce IEX-1 expression and Mcl-1 nuclear localization, in which they may act together to foster checkpoint and improve the tumor resistance to DNA damage. Deciphering the pathways involved in IEX-1 degradation should lead to the discovery of new therapeutic targets to increase tumor cells sensitivity to chemotherapy.

Materials and Methods

Chemicals and antibodies. Hydroxyurea, the proteasome inhibitor LLnL, etoposide, caffeine, cytochalasin B and colcemid were purchased from Sigma

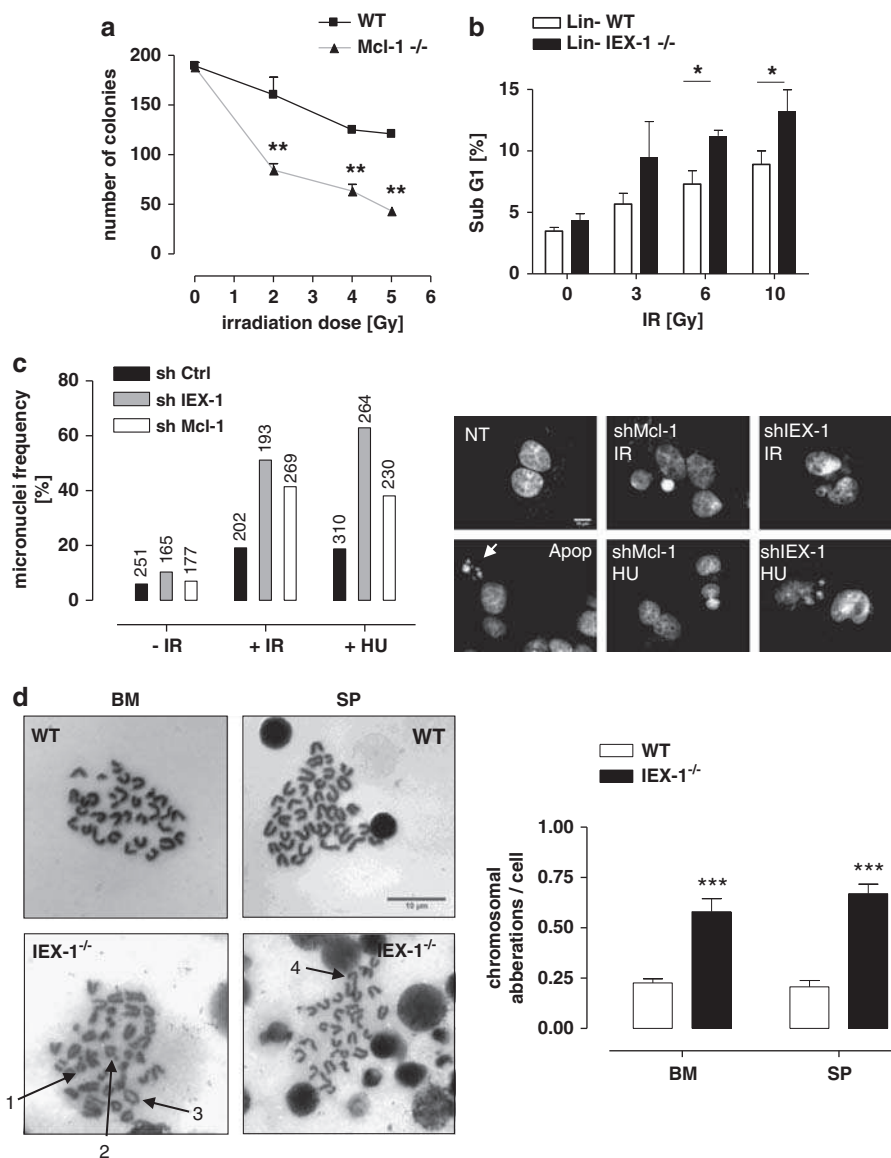


Figure 8 IEX-1 or Mcl-1-deficient cells show genomic instability and increased susceptibility to DNA damage. (a) WT and Mcl-1^{-/-} MEFs were irradiated with the indicated doses and tested in clonogenic assays. Means \pm S.D. of three independent experiments. (b) Lin⁻ cells isolated from WT and IEX-1^{-/-} mice were irradiated at various doses and the subG1 fraction was determined by PI staining 16 h later. Results are means and S.E.M. from three different mice. (c) HeLa cells were exposed to IR (10 Gy) or HU (1.5 mM), incubated with cytochalasin B (2 μ g/ml) for 24 h and then fixed and stained with DAPI. Binuclear cells were scored for micronuclei appearance. The number of cells scored for each point is indicated above the bars. Representative pictures show binuclear control cell (NT), micronuclei (shIEX-1, IR), multinucleation (shMcl-1, IR), nuclear blebbing (shIEX-1, HU), unequal division (shMcl-1, HU) and cell in apoptosis (Apop). (d) IEX-1^{-/-} and IEX-1^{+/+} mice were subjected to 7 Gy IR. The numbers of chromosomal breaks were evaluated in metaphase spreads of bone marrow (BM) and spleens (SP) 1 month later. Results are means \pm S.E.M. of aberrations found in at least 30 metaphases from each of five WT and five IEX-1^{-/-} mice for BM and three WT and five IEX-1^{-/-} mice for SP. Arrows indicate chromatid break (1 and 2) and chromatid fusion (3 and 4). Bars, 10 μ m. * P < 0.05; ** P < 0.01; *** P < 0.001

Aldrich (Saint Louis, MO, USA). Ku-55933 was from Calbiochem (Darmstadt, Germany). The antibodies used were as follows: rabbit serum anti-IEX-1 was described previously;¹⁶ anti-phospho antibodies to Chk1 (Ser345, Ser317 and Ser296), Chk2, ATM, NBS1, Rad17 and rabbit polyclonal anti- γ -H2AX (Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, MA, USA); anti-pSer10-Histone H3, mouse monoclonal anti- γ -H2AX and anti-GFP (Millipore, Billerica, MA, USA); anti-pRPA32 and anti-pSMC1 (Bethyl Labs, Montgomery, TX, USA); anti-Mcl-1 (S19), anti-ERK1 (K23), rabbit anti-Chk1 (F1476) and goat anti-IEX-1 (C20) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA); anti-HA (3F10 and 12CA5) and anti-Myc (9E10) (Roche Applied Science, Meylan, France); anti-RAD51 (Calbiochem); anti-actin (C40), anti-Flag (M2) and monoclonal anti-Chk1

(DCS-310) (Sigma Aldrich). Fluorochrome-conjugated antibodies, anti-rabbit AlexaFluor 594 and 647; anti-mouse AlexaFluor 405 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) and FITC anti-goat; FITC anti-mouse and Rhodamine anti-goat (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA).

Cells and mice. IEX-1^{-/-} and WT littermates mice on the mixed 129/Sv \times C57BL/6 background³⁷ were imported from the Mayo Clinic (Rochester, MN, USA) and housed in a specific pathogen-free environment. The experiments were conducted following standard ethical guidelines. Primary MEFs were obtained from IEX-1^{-/-} and IEX-1^{+/+} embryos at day 12 p.c. and resuspended in DMEM supplemented with 10% fetal calf serum (FCS), 1%

non-essential amino acids (NEAA, Invitrogen), 1% L-glutamine and 1% penicillin/streptomycin (PS). To obtain lineage-negative (Lin^-) hematopoietic progenitors, bone marrow cells from 1- to 3-month-old mice were harvested from tibiae and femurs and depleted of lineage-positive cells using the Biotin-conjugated Mouse Lineage Panel of antibodies and magnetic beads (BD Pharmingen, San Jose, CA, USA). Immortalized WT and Mcl-1 $^{-/-}$ MEFs² were a generous gift from JT Opferman (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis TN, USA). Cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS, 1% NEAA, 1% L-glutamine, 1% PS and 0.1 μM β -mercaptoethanol. Chinese hamster ovary (CHO) and HeLa cells were cultured in Dulbecco's MEM Mix F-12 and DMEM, respectively, supplemented with 10% FCS. ATM WT (HSC93) and ATM-null (AT GM3189) human lymphoblasts were grown in RPMI medium with 12% FCS. All irradiation experiments were carried out using a Biobeam 8000 irradiator (Gamma Service Medical GmbH, Leipzig, Germany). All commercially available cell lines were from the American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA).

Plasmids, infections and transfections. IEX-1 constructs were described previously.^{16,23} pcDNA-HA-IEX-1 deleted of its transmembrane domain (IEX-1- Δ TM) was generated by removing amino acids 86–101,²¹ using QuickChange site-directed mutagenesis kit (Stratagene, La Jolla, CA, USA). IEX-1 WT and Δ TM were subcloned in pTRIP Δ U3-EF1 α -IRES-GFP³⁸ or in pRetro-x-IRES-DsRed (Clontech, Mountain View, CA, USA) lentiviral and retroviral vectors, respectively. pTRIP Δ U3-EF1 α -GFP encoding shRNAs against IEX-1 or controls (shScramble or shGFP) were previously described.³⁸ The vector encoding shRNA for murine IEX-1 was constructed as above using 5'-CATTGCCAAGAGGGTCCTC-3' (nucleotides 243–261) as the target sequence. pLL3.7 lentiviral constructs encoding three different shRNAs for Mcl-1 and GFP³⁹ were gifts from A Nencioni (MIT, Cambridge, MA, USA). Myc-Mcl-1 was provided by M-C Hung (University of Texas, MD Anderson Cancer Center, Houston, TX, USA). Myc-Mcl-1- Δ Cter was made by deletion of amino acids 330–350 by adding a stop codon by PCR amplification. Myc-Mcl-1 WT and Δ Cter cDNAs were then subcloned into pRetro-x-IRES-DsRed. Transient transfection of CHO and HeLa cells were performed with Lipofectamine (Invitrogen), as described.²³ Production and titration of retroviral and lentiviral particles and infections were performed as described.³⁸ The infection efficiency was assayed by testing DsRed or GFP expression using flow cytometry.

Immunoprecipitation and subcellular fractionation. Immunoprecipitation procedures were described previously.²³ For subcellular fractionation, cells were lysed in 10 mM HEPES, pH 7.9, 10 mM KCl, 1.5 mM MgCl₂, 0.34 M sucrose, 10% glycerol, 1 mM DTT, 10 mM NaF, 1 mM Na₂VO₃, 0.1% Triton X-100 and Roche protease inhibitor cocktail for 5 min at 4°C. After centrifugation (4 min, 1300 \times g, 4°C), the nuclear pellet was resuspended in 50 mM Tris pH 7.5, 137 mM NaCl, 0.5% NP-40, 10% glycerol, 1 mM EDTA, 1 mM Na₂VO₃, 20 mM NaF and 1 mM sodium pyrophosphate.

Immunofluorescence. Cells grown on glass coverslips were fixed with 3.7% paraformaldehyde (15 min at room temperature (RT)), washed with PBS and permeabilized with ice-cold methanol followed by incubation in blocking buffer (10% horse serum, 1% BSA for γ -H2AX and Mcl-1 or 0.3% BSA, 0.2% glycine for IEX-1) for 1 h at RT and with primary antibodies (in PBS with 0.1% Triton X-100) overnight at 4°C. Fluorescent-conjugated secondary antibody was then added for 1 h at RT. Nuclei were counterstained with DAPI. To detect chromatin-bound proteins, soluble proteins were pre-extracted with detergent before fixation: the cells were washed and incubated for 1 min at RT in 60 mM PIPES, 25 mM HEPES-KOH, pH 6.9, 10 mM EGTA, 2 mM MgCl₂ and 0.5% Triton X-100 and then fixed with ice-cold methanol for 5 min at -20°C , before staining, as above. All slides were visualized using Leica DMI 6000 microscope (Wetzlar, Germany) equipped with a 63 \times 1.6 oil-immersion objective and a MicroMAX 1300Y camera (Princeton Instruments, Trenton, NJ, USA). Pictures were analyzed using ImageJ software (developed at the National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Comet assay. Cells were mock-treated or irradiated at 10 Gy and were either transferred directly on ice or allowed to recover at 37°C for 1 h. Neutral comet assay was performed using the CometAssay kit (Trevigen Inc., Gaithersburg, MD, USA). After drying, slides were stained with Hoechst 33342 and comet tails were visualized by a fluorescent microscope Leica DMI 6000 and analyzed using TriTek CometScore software (Tritek Corp., Sumerduck, VA, USA).

Survival assay. For clonogenic survival assays, MEFs were irradiated with various doses, transferred to 10 cm diameter dishes and allowed to grow for 6 days (MEFs). The cells were then fixed with ice-cold methanol and stained with 0.5% Giemsa solution. Colonies containing >50 cells were scored. Apoptosis of Lin^- progenitors was evaluated by measuring SubG1 DNA contents 16 h after IR, using Cytomix TM FC500, Beckman Coulter flow cytometer (Beckman Coulter France, Villepinte, France).

Genomic instability. Genomic instability *in vitro* was assessed by micronuclei appearance. Cells were incubated with cytochalasin B (2 $\mu\text{g}/\text{ml}$) for 24 h. After fixation and DNA staining with DAPI, binuclear cells were scored for micronuclei. To evaluate chromosomal aberrations after whole-body irradiation, IEX-1 $^{-/-}$ and age-matched control mice were exposed to IR (7 Gy). After 1 month, the mice were killed and bone marrow and spleen cell suspensions were prepared. Bone marrow cells were cultured in DMEM supplemented with 10% FCS. Splenocytes were resuspended in RPMI containing 12% FCS and concanavalin A (5 $\mu\text{g}/\text{ml}$). After 48 h, the cells were incubated in the presence of colcemid for 3 h, fixed, and metaphase spreads were prepared, as described.⁴⁰ At least 30 metaphases from each sample were scored for the presence of deletions, fusions and triradial chromatid chromosomal aberrations.

BrdU labeling and cell cycle analysis. 30 min before test time points, the cells were pulsed labeled with 30 μM BrdU (Invitrogen), washed and fixed in 70% ethanol. Staining with anti-BrdU antibody and PI was described previously.²⁶ Samples were analyzed by flow cytometry using CellQuest software (BD Biosciences, Le Pont de Claix, France).

Statistical analysis. Results were statistically evaluated using two-way ANOVA and Bonferroni comparison post-test or *t*-test using GraphPad PrismTM version 4.0 software (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, USA). Results are shown as means \pm S.E.M. and the value of $*P < 0.05$ was determined as significant, and of $**P < 0.01$ or $***P < 0.001$ as highly significant.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

Acknowledgements. We thank Drs. JF Opferman for the generous gift of Mcl-1 $^{-/-}$ MEFs, A Nencioni for pLL3.7 encoding Mcl-1-specific shRNAs and M-H Hung for Myc-Mcl-1 construct. This work was supported by grants from Association for International Cancer Research (AICR, 07-0065), Association pour la Recherche sur le Cancer (A06/1/4012), Ligue Contre le Cancer (RS08/75-28) and Fondation de France (2006008194). PP and IL were supported by fellowships from Fondation pour le Recherche Médicale, DIM STEM-Pôle and from AICR, respectively.

1. Bartek J, Lukas J. DNA damage checkpoints: from initiation to recovery or adaptation. *Curr Opin Cell Biol* 2007; **19**: 238–245.
2. Opferman JT, Letai A, Beard C, Sorcinelli MD, Ong CC, Korsmeyer SJ. Development and maintenance of B and T lymphocytes requires antiapoptotic MCL-1. *Nature* 2003; **426**: 671–676.
3. Opferman JT, Iwasaki H, Ong CC, Suh H, Mizuno S, Akashi K et al. Obligate role of anti-apoptotic MCL-1 in the survival of hematopoietic stem cells. *Science* 2005; **307**: 1101–1104.
4. Rinkenberger JL, Horning S, Klocke B, Roth K, Korsmeyer SJ. Mcl-1 deficiency results in peri-implantation embryonic lethality. *Genes Dev* 2000; **14**: 23–27.
5. Nijhawan D, Fang M, Traer E, Zhong Q, Gao W, Du F et al. Elimination of Mcl-1 is required for the initiation of apoptosis following ultraviolet irradiation. *Genes Dev* 2003; **17**: 1475–1486.
6. Yang T, Kozopas KM, Craig RW. The intracellular distribution and pattern of expression of Mcl-1 overlap with, but are not identical to, those of Bcl-2. *J Cell Biol* 1995; **128**: 1173–1184.
7. Cory S, Huang DC, Adams JM. The Bcl-2 family: roles in cell survival and oncogenesis. *Oncogene* 2003; **22**: 8590–8607.
8. Zhang D, Li F, Weidner D, Mnjoyan ZH, Fujise K. Physical and functional interaction between myeloid cell leukemia 1 protein (MCL1) and Fortilin. The potential role of MCL1 as a fortilin chaperone. *J Biol Chem* 2002; **277**: 37430–37438.
9. Fujise K, Zhang D, Liu J, Yeh ET. Regulation of apoptosis and cell cycle progression by MCL1. Differential role of proliferating cell nuclear antigen. *J Biol Chem* 2000; **275**: 39458–39465.
10. Jamil S, Sobouti R, Hojabrpour P, Raj M, Kast J, Duronio V. A proteolytic fragment of Mcl-1 exhibits nuclear localization and regulates cell growth by interaction with Cdk1. *Biochem J* 2005; **387**: 659–667.

11. Kumar R, Lutz W, Frank E, Im HJ. Immediate early gene X-1 interacts with proteins that modulate apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* 2004; **323**: 1293–1298.
12. Yoon S, Ha HJ, Kim YH, Won M, Park M, Ko JJ *et al*. IEX-1-induced cell death requires BIM and is modulated by MCL-1. *Biochem Biophys Res Commun* 2009; **382**: 400–404.
13. Arit A, Grobe O, Sieke A, Kruse ML, Folsch UR, Schmidt WE *et al*. Expression of the NF-kappa B target gene IEX-1 (p22/PRG1) does not prevent cell death but instead triggers apoptosis in HeLa cells. *Oncogene* 2001; **20**: 69–76.
14. Arit A, Rosenstiel P, Kruse ML, Grohmann F, Minkenberg J, Perkins ND *et al*. IEX-1 directly interferes with RelA/p65 dependent transactivation and regulation of apoptosis. *Biochim Biophys Acta* 2008; **1783**: 941–952.
15. Shen L, Guo J, Santos-Berrios C, Wu MX. Distinct domains for anti- and pro-apoptotic activities of IEX-1. *J Biol Chem* 2006; **281**: 15304–15311.
16. Garcia J, Ye Y, Arranz V, Letourneau C, Pezeron G, Porteu F. IEX-1: a new ERK substrate involved in both ERK survival activity and ERK activation. *EMBO J* 2002; **21**: 5151–5163.
17. Mittal A, Papa S, Franzoso G, Sen R. NF-kappaB-dependent regulation of the timing of activation-induced cell death of T lymphocytes. *J Immunol* 2006; **176**: 2183–2189.
18. Zhang Y, Schlossman SF, Edwards RA, Ou CN, Gu J, Wu MX. Impaired apoptosis, extended duration of immune responses, and a lupus-like autoimmune disease in IEX-1-transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 878–883.
19. Rocher G, Letourneau C, Lenormand P, Porteu F. Inhibition of B56-containing protein phosphatase 2As by the early response gene IEX-1 leads to control of Akt activity. *J Biol Chem* 2007; **282**: 5468–5477.
20. Jamil S, Mojtavai S, Hojabrpour P, Cheah S, Duronio V. An essential role for MCL-1 in ATR-mediated CHK1 phosphorylation. *Mol Biol Cell* 2008; **19**: 3212–3220.
21. Kondratyev AD, Chung KN, Jung MO. Identification and characterization of a radiation-inducible glycosylated human early-response gene. *Cancer Res* 1996; **56**: 1498–1502.
22. Kruse ML, Arit A, Sieke A, Grohmann F, Grossmann M, Minkenberg J *et al*. Immediate early gene X1 (IEX-1) is organized in subnuclear structures and partially co-localizes with promyelocytic leukemia protein in HeLa cells. *J Biol Chem* 2005; **280**: 24849–24856.
23. Letourneau C, Rocher G, Porteu F. B56-containing PP2A dephosphorylate ERK and their activity is controlled by the early gene IEX-1 and ERK. *EMBO J* 2006; **25**: 727–738.
24. van Vugt MA, Bras A, Medema RH. Polo-like kinase-1 controls recovery from a G2 DNA damage-induced arrest in mammalian cells. *Mol Cell* 2004; **15**: 799–811.
25. Kamer I, Sarig R, Zaltsman Y, Niv H, Oberkovitz G, Regev L *et al*. Proapoptotic BID is an ATM effector in the DNA-damage response. *Cell* 2005; **122**: 593–603.
26. Zermati Y, Mouhamad S, Stergiou L, Besse B, Galluzzi L, Bohrer S *et al*. Nonapoptotic role for Apaf-1 in the DNA damage checkpoint. *Mol Cell* 2007; **28**: 624–637.
27. Zinkel SS, Hurov KE, Ong C, Abtahi FM, Gross A, Korsmeyer SJ. A role for proapoptotic BID in the DNA-damage response. *Cell* 2005; **122**: 579–591.
28. Dumay A, Laulier C, Bertrand P, Saintigny Y, Lebrun F, Vayssières JL *et al*. Bax and Bid, two proapoptotic Bcl-2 family members, inhibit homologous recombination, independently of apoptosis regulation. *Oncogene* 2006; **25**: 3196–3205.
29. Zhan Q, Bieszczad CK, Bae I, Fornace Jr AJ, Craig RW. Induction of BCL2 family member MCL1 as an early response to DNA damage. *Oncogene* 1997; **14**: 1031–1039.
30. Chen Y, Sanchez Y. Chk1 in the DNA damage response: conserved roles from yeasts to mammals. *DNA Repair (Amst)* 2004; **3**: 1025–1032.
31. Lee J, Kumagai A, Dunphy WG. Claspin, a Chk1-regulatory protein, monitors DNA replication on chromatin independently of RPA, ATR, and Rad17. *Mol Cell* 2003; **11**: 329–340.
32. Mailand N, Bekker-Jensen S, Bartek J, Lukas J. Destruction of claspin by SCFbetaTrCP restrains Chk1 activation and facilitates recovery from genotoxic stress. *Mol Cell* 2006; **23**: 307–318.
33. Peschiaroli A, Dorrello NV, Guardavaccaro D, Venere M, Halazonetis T, Sherman NE *et al*. SCFbetaTrCP-mediated degradation of claspin regulates recovery from the DNA replication checkpoint response. *Mol Cell* 2006; **23**: 319–329.
34. Zhang YW, Ottemess DM, Chiang GG, Xie W, Liu YC, Mercurio F *et al*. Genotoxic stress targets human Chk1 for degradation by the ubiquitin-proteasome pathway. *Mol Cell* 2005; **19**: 607–618.
35. Leung-Pineda V, Ryan CE, Piwnicka-Worms H. Phosphorylation of Chk1 by ATR is antagonized by a Chk1-regulated protein phosphatase 2A circuit. *Mol Cell Biol* 2006; **26**: 7529–7538.
36. van Delft MF, Wei AH, Mason KD, Vandenberg CJ, Chen L, Czabotar PE *et al*. The BH3 mimetic ABT-737 targets selective Bcl-2 proteins and efficiently induces apoptosis via Bak/Bax if Mcl-1 is neutralized. *Cancer Cell* 2006; **10**: 389–399.
37. Sommer SL, Berndt TJ, Frank E, Patel JB, Redfield MM, Dong X *et al*. Elevated blood pressure and cardiac hypertrophy after ablation of the gly96/IEX-1 gene. *J Appl Physiol* 2006; **100**: 707–716.
38. Hamelin V, Letourneau C, Romeo PH, Porteu F, Gaudry M. Thrombopoietin regulates IEX-1 gene expression through ERK-induced AML1 phosphorylation. *Blood* 2006; **107**: 3106–3113.
39. Nencioni A, Hua F, Dillon CP, Yokoo R, Scheiermann C, Cardone MH *et al*. Evidence for a protective role of Mcl-1 in proteasome inhibitor-induced apoptosis. *Blood* 2005; **105**: 3255–3262.
40. Naim V, Rosselli F. The FANCD pathway and BLM collaborate during mitosis to prevent micro-nucleation and chromosome abnormalities. *Nat Cell Biol* 2009; **11**: 761–768.

Supplementary Information accompanies the paper on Cell Death and Differentiation website (<http://www.nature.com/cdd>)

Annexe2

Figures Discussion

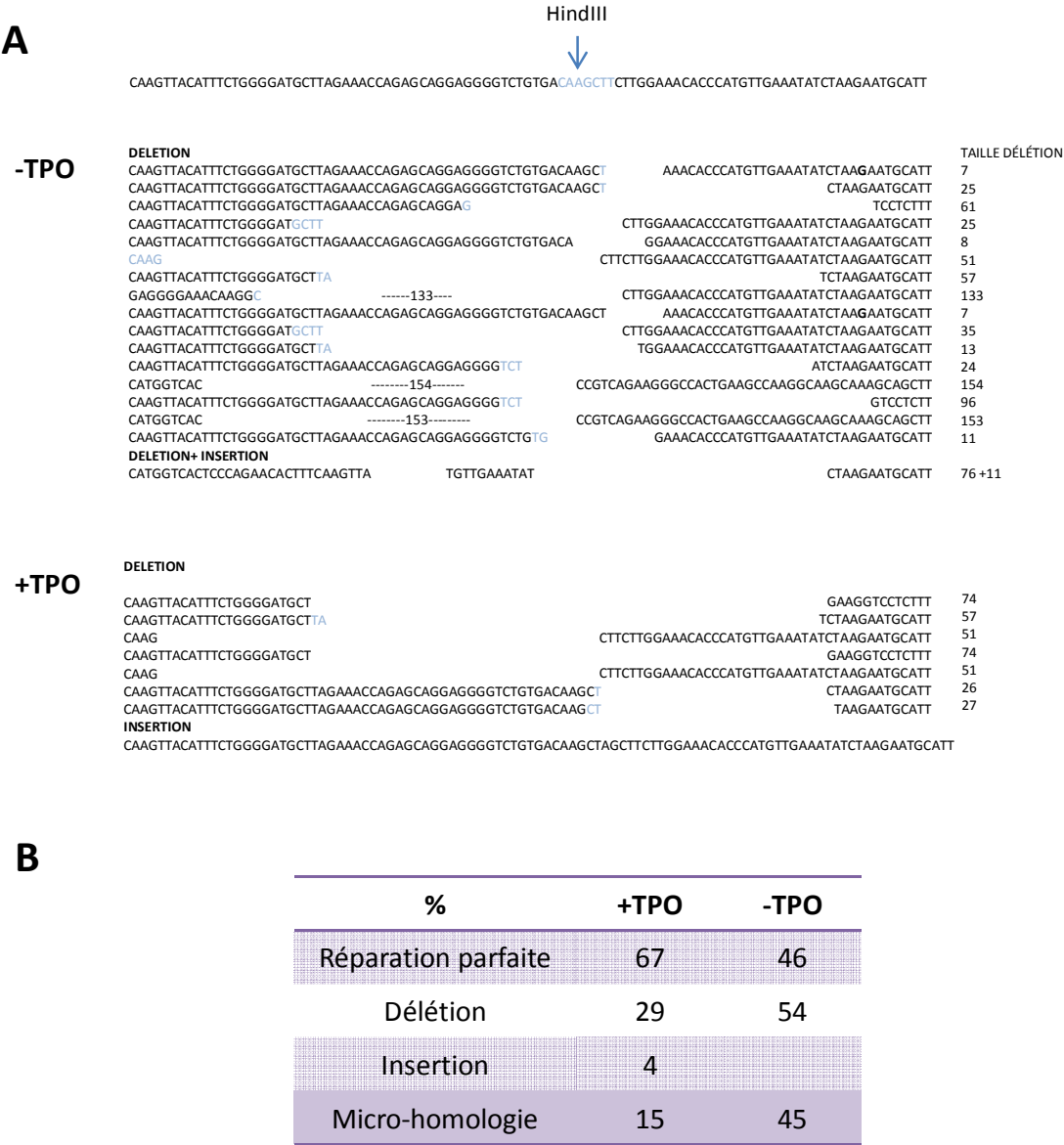
Figure 1: En absence de TPO, les cellules utilisent une voie Alt-NHEJ pour réparer l'ADN

Figure 2 : Mpl tumeur supresseur ?

Figure 3 : En présence de IEX-1, Mcl-1 migre dans le noyau des LSK après irradiation. Cette translocation n'est pas nécessaire à la réparation de l'ADN induite par la TPO

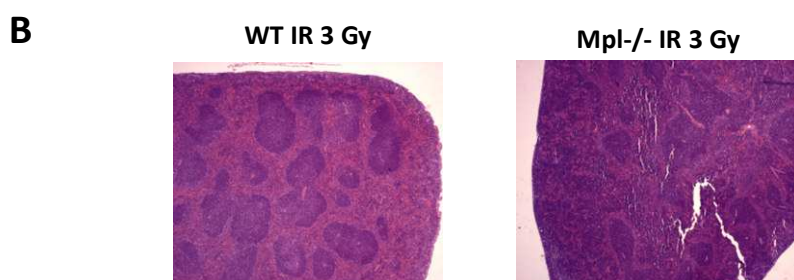
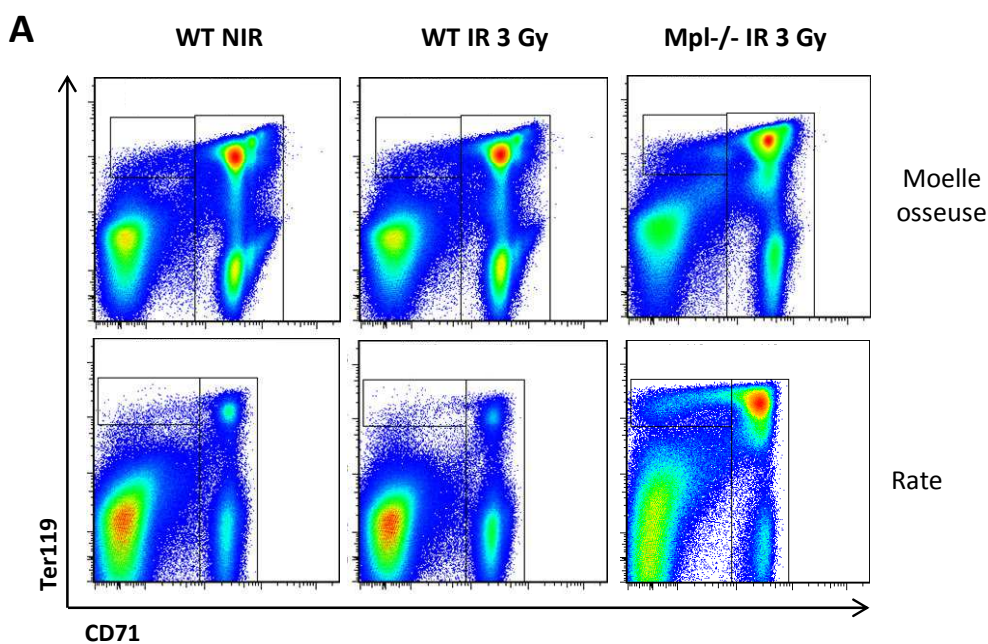
Figure 4 : Le niveau de Mpl est déterminant dans l'activation des voies de signalisation

Figure 1



En absence de TPO, les cellules utilisent une voie Alt-NHEJ pour réparer l’ADN

- (A) Exemple de séquences mal réparées en présence et en absence de TPO dans les UT7-Mpl. Les séquences en bleu représentent les microhomologies.
- (B) Pourcentage de séquences présentant une réparation parfaite ou avec des défauts et ayant des microhomologies par rapport au nombre total de séquences analysées.

Figure 2

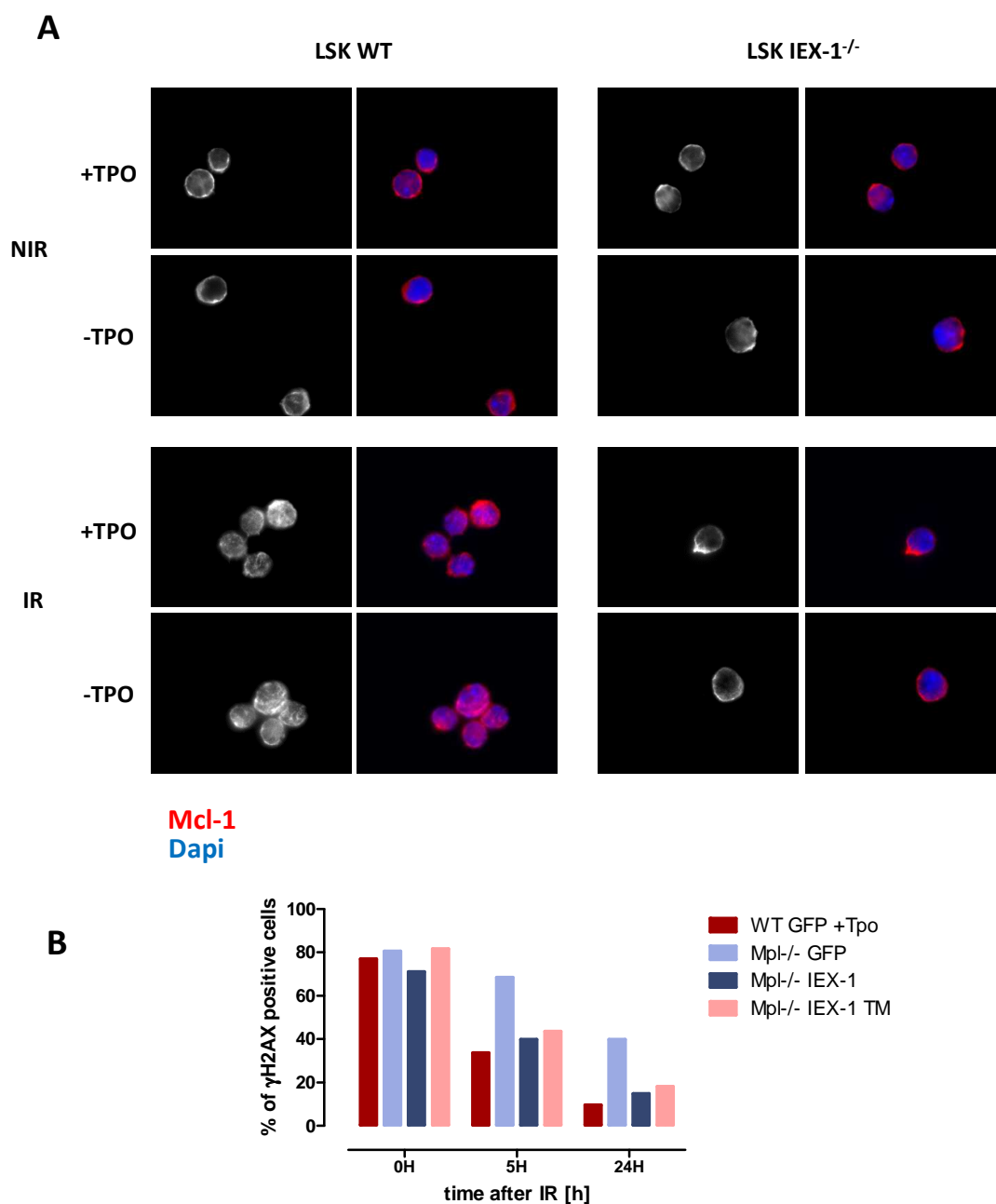
Mpl tumeur supresseur ?

Six mois après une irradiation de 3 Gy, une souris Mpl^{-/-} a présenté un blocage de différenciation des érythrocytes dans la moelle et dans la rate ainsi qu'une splénomégalie et une déstructuration de la rate.

(A) Profil de cytométrie en flux après marquage des érythrocytes en cours de différenciation dans la moelle osseuse et dans la rate.

(B) Analyse histologique de la rate.

Figure 3



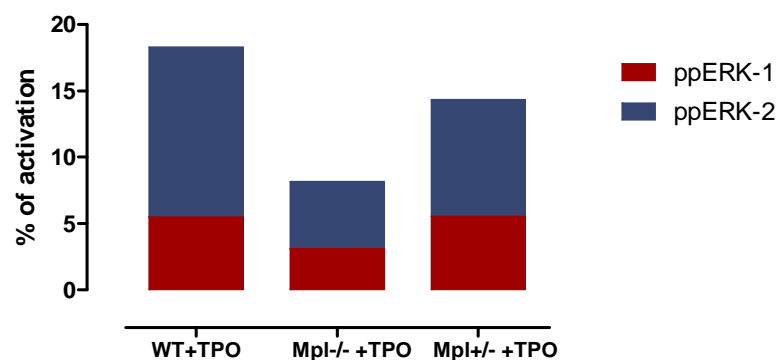
En présence de IEX-1, Mcl-1 migre dans le noyau des LSK après irradiation. Cette translocation n'est pas nécessaire à la réparation de l'ADN induite par la TPO

(A) ImmunoFluorescence de Mcl-1 dans des LSK WT/*Iex*^{-/-} 5h après irradiation à 2Gy (IR)/ sans irradiation (NIR) et cultivées dans un milieu complet (+TPO) ou sans TPO (-TPO).

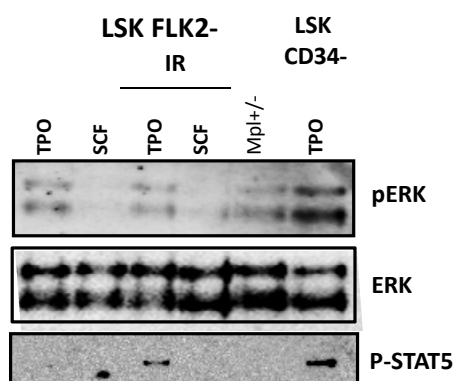
(B) Résolution des foci γ H2AX après irradiation *in vitro* des LSK WT ou *Mpl*^{-/-} infectés avec des lentivirus exprimant IEX-1, IEX-1 mutée au niveau de son site de fixation pour Mcl-1 (IEX-1 TM) ou contrôles (GFP).

Figure 4

A



B



Le niveau de Mpl est déterminant dans l'activation des voies de signalisation

(A) Expérience représentative de l'activation des ERK obtenus par NanoPro sur des lysats de cellules LSK WT, Mpl^{-/-} et Mpl^{+/-} cultivées dans un milieu complet. Les résultats sont exprimés en fonction de la quantité totale de ERK

(B) Analyse par western blot de la phosphorylation de ERK en réponse à la TPO ou au SCF dans des LSK-Flk2⁻ ou des LSK-CD34⁻. Les cellules ont été cultivées 1h en présence de la cytokine indiquée, puis irradiées ou non à 2Gy et les lysats ont été préparés 30 minutes plus tard.

Abréviations

53BP1 : p53-Binding Protein 1
5-FU : 5-Fluoracile
Alt-NHEJ : NHEJ alternative
ADN : Acide Désoxyribo-Nucléique
Ang1 : Angiopontine 1
AP2 : Adaptator Protein 2
ARN : Acide Ribo-Nucléique
ATM : Ataxia Telangiectasia Mutated
ATR : Ataxia Telangiectasia and Rad3 related
ATRIP : ATR Interacting Protein
BER : Base Excision Repair
BRCA-1/2 : Breast Cancer type 1/2
BrdU : Bromodeoxyuridine
CAFC : Cobblestone Area-Forming Cell
CAMT : Congenital Amegacaryocytic Thrombopenia
CAR : CXCL12 Abundant Reticular Cell
Cbl : Casitas B-lineage Lymphoma
CDK : Cyclin Dependent Kinase
CFU : Colony Forming Unit
Chk-1/2 : Checkpoint 1/2
CLP : Common Lymphoid Progenitor
CMP : Common Myeloid Progenitor
CS : Cellule Souche
CSH : Cellule Souche hématopoïétique
DNA-PK : DNA-dependent protein kinase
EPO : Erythropoïétine
ERK : Extracellular signal-Regulated Kinases
FANC : Fanconi
F-MLV : Friend Mouse Leukemia Virus
Flt-3 : FMS-like tyrosine kinase
Gab2 : Grb2-associated binding protein 2
G-CSF : Granulocyte Colony Forming Unit
GGR : Global Genome Repair
GMP : Granulo-Myeloid Progenitor
Grb2 : Growth factor receptor-Bound 2
Ig : immunoglobuline
IL : Interleukine
INF : Interféron
IRF-1/2 : : Interferon Regulatory *Factor*
Jak : Janus Kinase
JH : Jak Homology domain
JNK : Jun NH(2)-terminal kinase
LAM : leucémie aigüe myéloïde
Lin : Lineage
LMC : Leucémie myéloïdes chronique
LSK : Cellule négative pour les marqueurs des lignages, et positive pour SCA et KIT
LTC-IC : Long Term Culture Initiating Cell
LT-CSH : CSH pouvant reconstituer à Long Terme
MAPK : Mitogen Activated Protein Kinase
MDC1 : Mediator of DNA damage Checkpoint 1
MEC : matrice extra-cellulaire

MEP : Myelo-Erythro Progenitor
 MMR : MisMatch Repair
 Mpl : Myelo-Proliferative Leukemia
 MPP : MultiPotent Progenitor
 MRN : Mre11-Rad50-Nbs1
 NER : Nucleotide Excision Repair
 NF- κ B : Nuclear Factor-*Kappa B*
 MFP : Myélo-Fibrose Primaire
 NHEJ: Non Homologous End Joining
 NMP : Néoplasme Myélo-Prolifératif
 NOD/SCID : Non Obese Diabetic-Severe Combined ImmunoDeficiency
 NPF : Nucleo Protein Filament
 OPN : Osteopontine
 PALB2 : Partner And Localizer of BRCA2
 PARP : Poly (ADP-ribose) polymerase
 PCNA : Proliferating Cell Nuclear Antigen
 PI3K : Phospho-Inositide-3-Kinase
 PV : Polycythémia Vera
 RH : Recombinaison Homologue
 ROS : Reactive Oxygen Species
 RPA : Replicative Protein A
 SCF : Stem Cell Factor
 SCID : Severe Combined Immuno-Deficiency
 SDF1 : Stromal cell-Derived Factor 1
 SFK : Src Family Kinase
 SH2 : Scr Homology 2
 SHC : Scr Homology 2 Domain Containing
 SHIP : SH2-containingInositol 5'-Phosphatase
 SHP1/2 : SH2 Containing Phosphatase 1/2
 SOCS : Suppressor of cytokine signaling
 SOS : Son Of Sevenless
 STAT : Signal Transducer and Activator of Transcription
 ST-CSH : CSH pouvant reconstituer à court terme
 TCR : Transcription Coupled Repair
 TE : Thombocytopénie Essentielle
 TH : Thrombocytopénie Héritaire
 TPO : Thrombopoïétine
 Tyk2 : Tyrosine Kinase 2
 VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule
 VDJ : "Variable, Diversity, Joining"
 XLF : XRCC4-Like Factor
 XRCC-1/4 : X-ray Repair Cross-Complementing 1/4

Résumé

A l'origine de l'hématopoïèse se trouve les cellules souches hématopoïétiques (CSH). Elles constituent un pool de cellules rares présentes dans la moelle osseuse aux niveaux de zones particulières de l'os appelées niche. Les cellules de la niche produisent des cytokines, telles que la thrombopoïétine (TPO), qui régulent les CSH en contrôlant leur quiescence et leur auto-renouvellement. Peu de choses sont connues sur les mécanismes mis en place par la CSH et son environnement pour faire face aux dommages de l'ADN, notamment induits lors de radio- ou chimiothérapies.

Durant cette étude, nous avons mis en évidence un nouveau rôle de la TPO et de son récepteur Mpl dans la réparation de l'ADN des CSH en réponse à des stress génotoxiques. Les CSH déficientes ou haplo-insuffisantes pour Mpl, ou les CSH sauvages et cultivées en absence de TPO, présentent un défaut de réparation et une instabilité génomique. En réponse à l'irradiation, la TPO potentialise l'activation de la voie NF- κ B qui permet l'induction du gène précoce *Iex-1*. La TPO est également l'activateur majeur de la voie ERK dans les CSH. IEX-1 et pERK forment un complexe tripartite avec DNA-PK, une protéine clé de la voie Non Homologous End Joining (NHEJ). La DNA-PK est fortement activée par la TPO, ce qui augmente la fidélité et l'efficacité de la voie NHEJ et permet d'améliorer l'intégrité génomique des CSH. Par ailleurs, nous montrons qu'une simple injection de TPO ou de son agoniste Romiplostim, avant irradiation ou injection de doxorubicine, limite la mutagénèse des CSH et leur perte de fonction associée. Cet effet est spécifique de la TPO, d'autres cytokines comme le SCF et le Flt3-L, n'ont aucun effet sur la réparation.

Ces résultats montrent que la TPO contrôle directement les voies de signalisation aboutissant à la réparation de l'ADN des CSH. Ils ouvrent des perspectives nouvelles pour l'utilisation des agonistes de la TPO comme adjuvant protecteur avant radio- ou chimiothérapie pour minimiser les risques de développement de leucémies aigües myéloïdes secondaires. L'expression de Mpl étant haploinsuffisante pour la fonction de réparation de l'ADN, ces résultats suggèrent que Mpl pourrait être tumeur suppresseur en réponse aux traitements chimio-ou radio-thérapeutiques.

MOTS CLES : Thrombopoïétine, cellule souche hématopoïétique, réparation de l'ADN, voies de signalisation